

## INFORMATION TO USERS

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps. Each original is also photographed in one exposure and is included in reduced form at the back of the book.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

**UMI<sup>®</sup>**

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600

Université de Sherbrooke

**Régulation de l'expression des gènes de la préproendothéline-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> par les glucocorticoïdes dans les CMLV et l'aorte de rat : implications dans le système cardio-vasculaire**

Par

Catherine Morin

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

Janvier 1999



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-56945-4

**Canada**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RÉSUMÉ</b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1. LES GLUCOCORTICOÏDES.....</b>	<b>1</b>
1. 1 STRUCTURE ET BIOSYNTHÈSE.....	1
1. 2 RÉGULATION DE LA SÉCRÉTION.....	3
1. 3 TRANSPORT, MÉTABOLISME ET EXCRÉTION.....	5
1. 4 MÉCANISME D'ACTION.....	5
1. 5 RÔLES.....	7
1. 5. 1 Système cardio-vasculaire.....	7
1. 5. 2 Métabolisme intermédiaire.....	8
1. 5. 3 Système immunitaire.....	8
1. 5. 4 Autres .....	9
<b>2. LES GLUCOCORTICOÏDES ET L'HYPERTENSION.....</b>	<b>10</b>
2. 1 HYPERTENSION.....	10
2. 2 HYPERTENSION INDUITE PAR LES GLUCOCORTICOÏDES.....	11
2. 3 HYPERTENSION INDUITE PAR LES GLUCOCORTICOÏDES VERSUS HYPERTENSION INDUITE PAR LES MINÉRALOCORTICOÏDES.....	12
2. 4 LES GLUCOCORTICOÏDES DANS L'HYPERTENSION ESSENTIELLE.....	13
2. 5 EFFETS HYPERTENSEURS DES GLUCOCORTICOÏDES .....	14
2. 5. 1 Augmentation de la réactivité vasculaire.....	14

2. 5. 2	Inhibition de production de vasodilatateurs.....	15
2. 5. 3	Augmentation de production de vasopresseurs.....	16
2. 5. 3. 1	Angiotensine II.....	16
2. 5. 3. 2	Endothéline-1.....	16
<b>3.</b>	<b>LES ENDOTHÉLINES.....</b>	<b>18</b>
3. 1	STRUCTURE ET BIOSYNTHESE.....	19
3. 2	LEURS RÉCEPTEURS.....	21
3. 2. 1	LE RÉCEPTEUR ET <sub>A</sub> .....	21
3. 2. 2	LE RÉCEPTEUR ET <sub>B</sub> .....	21
3. 2. 3	VOIE DE SIGNALISATION.....	23
3. 2. 4	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES RÉCEPTEURS ET <sub>A</sub> ET ET <sub>B</sub> .....	24
3. 2. 5	RÉGULATION DES RÉCEPTEURS ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub> .....	24
<b>4.</b>	<b>L'ENDOTHÉLINE-1.....</b>	<b>25</b>
4. 1	BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU GÈNE DE LA PRÉPROENDOTHÉLINE-1.....	25
4. 2	RÉGULATION DE L'ENDOTHÉLINE-1 DANS LA PAROI VASCULAIRE.....	26
4. 3	ACTIONS BIOLOGIQUES DE L'ENDOTHÉLINE-1.....	30
4. 3. 1	Régulateur de la pression artérielle.....	30
4. 3. 2	Effets cardiaques.....	31
4. 3. 3	Effets rénaux.....	31
4. 3. 4	Agent mitogénique et hypertrophique.....	32
4. 3. 5	Autres.....	32
4. 4	RÔLE DE L'ENDOTHÉLINE-1 DANS DIVERSES CONDITIONS PATHOPHYSIOLOGIQUES.....	33
<b>5.</b>	<b>RÉGULATION DE L'ENDOTHÉLINE-1 ET DE SES RÉCEPTEURS PAR LES GLUCOCORTICOÏDES .....</b>	<b>34</b>

## **6. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES.....36**

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES.....39**

### **1. ÉTUDES *IN VITRO* CHEZ LES CMLV.....39**

1. 1 ISOLATION ET CULTURE DES CMLV.....	39
1. 2 PASSAGE DES CELLULES.....	40
1. 3 IDENTIFICATION DES CELLULES PAR IMMUNOCYTOCHIMIE.....	41
1. 4 TRAITEMENT DES CELLULES AVEC LES STÉROÏDES.....	42
1. 5 DOSAGE DE L'ENDOTHÉLINE-1 DU MILIEU DE CULTURE .....	42
1. 6 ESSAI DE TRANSCRIPTION NUCLÉAIRE (NUCLEAR RUN-ON ASSAY).....	43
1. 6. 1 Préparation des noyaux.....	43
1. 6. 2 Elongation et purification des ARNs nouvellement transcrits .....	44
1. 6. 3. 1 Préparation des membranes de nitrocellulose .....	45
1. 6. 3. 2 Préhybridation, hybridation et lavages.....	46
1.7 MESURE DES NIVEAUX D'ARNm PAR ESSAI DE PROTECTION DES ARNm AUX ARNases.....	46
1. 7. 1 Extraction des ARNs cellulaires. ....	47
1. 7. 2 Préparation des sondes.....	48
1. 7. 3 Hybridation.....	49
1. 7. 4 Digestion par les ARNases et électrophorèse.....	49

### **2. ÉTUDES *IN VIVO* CHEZ LE RAT.....50**

2. 1 TRAITEMENT DES RATS.....	50
2. 2 MESURE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE.....	50
2. 3 DOSAGE DE L'ENDOTHÉLINE-1 PLASMATIQUE.....	51
2. 4 MESURE DES NIVEAUX D'ARNm PAR ESSAI DE PROTECTION DES ARNm AUX ARNases .....	52
2. 4. 1 Extraction des ARNs des aortes.....	52

## RÉSULTATS.....53

### 1. ÉTUDES *IN VITRO* CHEZ LES CMLV.....53

#### 1. 1 IDENTITÉ DES CMLV VÉRIFIÉE PAR IMMUNOCYTOCHIMIE.....53

#### 1. 2 LES GLUCOCORTICOÏDES STIMULENT LA SÉCRÉTION D'ENDOTHÉLINE-1 CHEZ LES CMLV.....53

#### 1. 3 EFFET DES GLUCOCORTICOÏDES SUR L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PPET-1 DANS LES CMLV.....56

##### 1. 3. 1 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 de façon rapide et transitoire.....56

##### 1. 3. 2 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 via le récepteur (type II) des glucocorticoïdes.....56

##### 1. 3. 3 Les glucocorticoïdes ne modifient pas la stabilité des messagers de la ppET-1.....59

##### 1. 3. 4 Les glucocorticoïdes augmentent la transcription *de novo* de la ppET-1....61

##### 1. 3. 5 L'induction d'expression du gène de la ppET-1 par les glucocorticoïdes ne nécessite pas la synthèse protéique.....63

#### 1. 4 EFFET DES GLUCOCORTICOÏDES SUR L'EXPRESSION DU GÈNE DU RÉCEPTEUR ET<sub>A</sub> DANS LES CMLV ET IMPLICATION DE LA RÉTROACTION NÉGATIVE PAR L'ENDOTHÉLINE-1.....65

##### 1. 4. 1 Les glucocorticoïdes diminuent l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub>...65

##### 1. 4. 2 Le rétrocontrôle négatif par l'endothéline-1 est en partie responsable de la diminution de l'expression du gène ET<sub>A</sub> par les glucocorticoïdes .....67

### 2. ÉTUDES *IN VIVO* CHEZ LE RAT.....69

#### 2. 1 LES GLUCOCORTICOÏDES ÉLÈVENT LA PRESSION ARTÉRIELLE CHEZ LE RAT (TRAITEMENT DE 6 JOURS).....69

2. 2 LES GLUCOCORTICOÏDES AUGMENTENT LES NIVEAUX D'ENDOTHÉLINE-1 PLASMATIQUE CHEZ LE RAT.....	69
2. 3 EFFETS DES GLUCOCORTICOÏDES SUR L'EXPRESSION DES GÈNES DE LA PPET-1 ET DU RÉCEPTEUR ET <sub>A</sub> DANS L'AORTE DE RAT.....	72
2. 3. 1 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 et diminuent l'expression du gène du récepteur ET <sub>A</sub> .....	72
2. 3. 2 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 de façon dose-dépendante.....	74
2. 3. 3 Les glucocorticoïdes élèvent la pression artérielle chez les rats (traitement de 8 heures).....	76
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>78</b>
<b>1. ÉTUDES <i>IN VITRO</i> CHEZ LES CMLV.....</b>	<b>78</b>
1. 1 EFFET DES GLUCOCORTICOÏDES SUR L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PPET-1.....	78
1. 2 EFFET DES GLUCOCORTICOÏDES SUR L'EXPRESSION DU GÈNE DU RÉCEPTEUR ET <sub>A</sub> DANS LES CMLV ET IMPLICATION DE LA RÉTROACTION NÉGATIVE PAR L'ENDOTHÉLINE-1.....	82
<b>2. ÉTUDE <i>IN VIVO</i> CHEZ LE RAT.....</b>	<b>84</b>
<b>3. CONCLUSION.....</b>	<b>87</b>
<b>4. PERSPECTIVES.....</b>	<b>88</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>90</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>91</b>



## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Table 1 :</b> Actions des glucocorticoïdes pouvant affecter la pression artérielle.....	17
<b>Figure 1 :</b> Voies de la stéroïdogénèse au niveau de la glande surrénale humaine.....	2
<b>Figure 2 :</b> Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes.....	4
<b>Figure 3 :</b> Séquence en acides aminés des trois membres de la famille des endothélines.....	20
<b>Figure 4 :</b> Régulation de l'endothéline-1 dans la paroi vasculaire.....	29
<b>Figure 5 :</b> Identification des CMLV par immunocytochimie.....	54
<b>Figure 6 :</b> Effet du RU 28362 sur la sécrétion d'endothéline-1 ir dans le milieu de culture des CMLV.....	55
<b>Figure 7 :</b> Cinétique de temps de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.....	57
<b>Figure 8 :</b> Courbe dose-réponse de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.....	58
<b>Figure 9 :</b> Effet de l'actinomycine D et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.....	60
<b>Figure 10 :</b> Effet du RU 28362 sur la transcription <i>de novo</i> de la ppET-1.....	62
<b>Figure 11 :</b> Effet de la cycloheximide et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.....	64
<b>Figure 12 :</b> Cinétique de temps de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm du récepteur ET <sub>A</sub> dans les CMLV.....	66
<b>Figure 13 :</b> Effet du BQ 123 et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm du récepteur ET <sub>A</sub> dans les CMLV.....	68
<b>Figure 14 :</b> Effet de l'administration de dexaméthasone sur la pression systolique des rats (traitement de 6 jours).....	70
<b>Figure 15 :</b> Effet de l'administration de dexaméthasone sur les niveaux d'endothéline-1 ir plasmatique chez les rats.....	71

<b>Figure 16 :</b> Effet du dexaméthasone sur l'expression des ARNm de la ppET-1 et du récepteur ET <sub>A</sub> dans l'aorte de rat.....	73
<b>Figure 17 :</b> Graphique dose-réponse de l'effet du dexaméthasone sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans l'aorte de rat.....	75
<b>Figure 18 :</b> Effet de l'administration du dexaméthasone sur la pression systolique des rats (traitement de 8 heures).....	77

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

## 1. Abréviations générales

11 $\beta$ -HSD	11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 $\beta$ -HSD II	3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase II
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] CTP	Cytidine triphosphate marqué au phosphore 32
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] UTP	Uridine triphosphate marqué au phosphore 32
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ACTH	Adénocorticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine 3', 5'- monophosphate cyclique
ANP	Peptide natriurétique de l'oreillette
AP-1	« Activator protein 1 »
APRE	« Acute phase reactant regulatory element »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BQ 123	Antagoniste du récepteur ET <sub>A</sub>
BQ 610	Antagoniste du récepteur ET <sub>A</sub>
BQ 788	Antagoniste du récepteur ET <sub>B</sub>
CBG	Protéine de liaison des corticostéroïdes
CGRP	« Calcitonin gene-related peptide »
CMLV	Cellules du muscle lisse vasculaire
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRH	Corticotropine

CTP	Cytidine triphosphate
CYP11A1	Desmolase
CYP11B1	11 $\beta$ -hydroxylase
CYP17	17 $\alpha$ -hydroxylase
CYP21A2	21-hydroxylase
DAG	Diacylglycérol
DEPC	Diéthyl Pyrocarbonate
DMEM	«Dulbecco's Modified Eagle Medium»
DTT	Dithiothreitol
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDTA	Ethylènediamine tétraacétate de sodium
EGF	« Endothelial growth factor »
ET	Endothéline
ET-1	Endothéline-1
ET-2	Endothéline-2
ET-3	Endothéline-3
ET <sub>A</sub>	Récepteur ET <sub>A</sub> de l'endothéline
ET <sub>B</sub>	Récepteur ET <sub>B</sub> de l'endothéline
ET <sub>C</sub>	Récepteur ET <sub>C</sub> de l'endothéline
FGF	« Fibroblast growth factor »
FITC	Fluorochrome
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GMPc	Guanosine 3', 5'- monophosphate cyclique
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GTP	Guanosine triphosphate
H <sub>2</sub> O	Eau
HBS	« Hanks' balanced salt solution »
HSP 90	« Heat Shock Protein 90 kDa »
IGF	« Insulin-like growth factor »
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate

IR	Immunoréactif
LDL	Lipoprotéines de faible densité
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MnCl <sub>2</sub>	Chlorure de manganèse
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF-1	« nuclear factor 1 »
NH <sub>4</sub> OAc	Acétate d'ammonium
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfate d'ammonium
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NOSi	Oxyde nitrique synthase inductible
PBS	Tampon phosphate salin
PDGF	« Platelet derived growth factor »
PIPES	Acide 1, 4-pipérazinediéthanesulfonique
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMN	Polymorphonucléaire
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
ppET-1	Préproendothéline-1
PSF	Pénicilline/Streptomycine/Amphotéricine
RIA	Radioimmunoétalonage
RU 28362	Agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes
RU 38486	Antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes
SBF	Sérum bovin foetal
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSC	Solution de chlorure de sodium et citrate de sodium
TFA	Acide trifluoroacétique
TGFβ	« Transforming growth factor β »
Trp	Résidu tryptophane

UTP	Uridine triphosphate
Val	Résidu valine
VIP	Peptide vasoactif intestinal

## **2. Unités de mesure**

cpm	Comptes par minute
fmol	Femtomole
g	Force centrifuge
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
L	Litre
M	Molaire
mm Hg	Millimètre de mercure
pb	Paire de base
rpm	Révolutions par minute

## LISTE DES PUBLICATIONS

**Morin, C.**, Asselin, C., Boudreau, F. et Provencher, P. H. (1998) Transcriptional regulation of preproendothelin-1 gene by glucocorticoids in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244** : 583-587.

Provencher, P.H., Villeneuve, A. et **Morin, C.** (1998) Glucocorticoids increase preproendothelin-1 expression in rat aorta. *Endocr. Res.* **24** (3&4) : 737-741.

Provencher, P.H., Villeneuve, A., Bernier, C. et **Morin, C.** Glucocorticoids modulate endothelin-1 and ET-A expression in the vasculature ; implications for the regulation action of these corticosteroids on blood pressure. Accepté dans Research Trends : Current Topics in Steroids Research.

## RÉSUMÉ

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées au niveau des glandes surrénales. Ces stéroïdes jouent un rôle important dans l'homéostasie du système cardio-vasculaire. En excès, ils causent l'hypertension. Les mécanismes amenant cette augmentation de la pression artérielle ne sont pas tout à fait élucidés. Plusieurs évidences suggèrent que ces stéroïdes agissent directement sur les vaisseaux sanguins pour moduler la résistance périphérique. Récemment, l'endothéline-1, un puissant agent vasopresseur, a été découvert. Ce peptide est impliqué dans le maintien du tonus vasculaire et est aussi associé à diverses maladies cardio-vasculaires. L'étude de la régulation de ce peptide par les glucocorticoïdes est importante puisque celui-ci pourrait être impliqué dans l'augmentation de la pression artérielle induite par les glucocorticoïdes.

Comme d'autres groupes, nos travaux démontrent que les glucocorticoïdes augmentent la synthèse d'endothéline-1 dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) de l'aorte de rat en culture. Nos travaux démontrent également que les glucocorticoïdes augmentent de 3,3 fois l'expression du gène du précurseur de l'endothéline-1 i.e. la préproendothéline-1 (ppET-1) dans les CMLV. Cette augmentation est rapide et transitoire. Le maximum d'induction est observé après 1 heure de traitement. Nous démontrons que cette augmentation est entièrement attribuable à une augmentation de la transcription *de novo* du gène de la ppET-1 puisque la stabilité du messenger n'est pas affectée. De plus, cette augmentation ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines.



Des études sur la régulation par les glucocorticoïdes de l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub> de l'endothéline-1 ont également été effectuées dans les CMLV. Nos résultats démontrent que les glucocorticoïdes diminuent de moitié l'expression du gène ET<sub>A</sub>. Cette diminution est observable dès 4 heures d'incubation avec les glucocorticoïdes et est maximale après 12 heures. L'utilisation d'un antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub> révèle que cette diminution est en partie attribuable au rétrocontrôle exercé par l'endothéline-1, induite par les glucocorticoïdes, sur l'expression du récepteur ET<sub>A</sub>.

Finalement, des études *in vivo* chez le rat révèlent que l'expression de la ppET-1 est augmentée et l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> diminuée dans l'aorte suite à un traitement aux glucocorticoïdes. L'augmentation de l'expression de la ppET-1 est rapide (1 heure) et est maximale après 8 heures de traitement avec une augmentation de 2,5 fois. La diminution de l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> est maximale à 4 heures avec une perte de la moitié de l'expression du gène. L'augmentation de l'expression de la ppET-1 s'accompagne d'une hausse de 13 mm HG de la pression artérielle chez le rat. De plus, nos travaux démontrent que le traitement aux glucocorticoïdes chez les rats augmentent les niveaux d'endothéline-1 plasmatique de 84% après 5 jours.

Ces résultats suggèrent donc que l'induction par les glucocorticoïdes de l'expression de la ppET-1 et l'augmentation des niveaux d'endothéline-1 plasmatique chez le rat contribuent à l'action régulatrice de ce corticostéroïde sur la pression artérielle.

# INTRODUCTION

## 1. LES GLUCOCORTICOÏDES

### 1. 1 Structure et biosynthèse

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes. Elles sont dérivées du cholestérol et partagent avec les autres stéroïdes un noyau cyclopentanoperhydrohénanthrène, qui est une structure formée de quatre anneaux et de groupements latéraux. Les stéroïdes se distinguent les uns des autres par ces groupements latéraux.

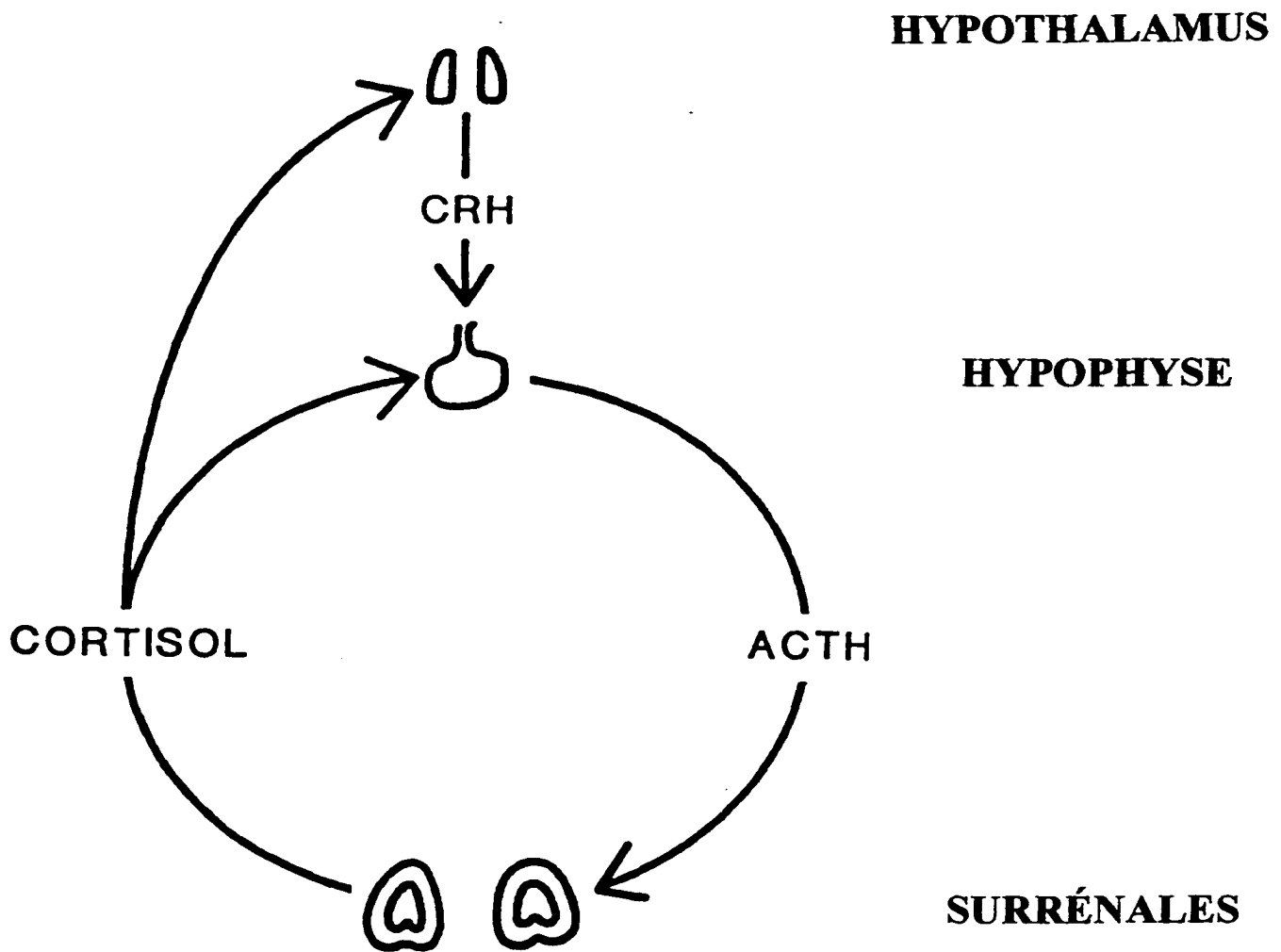
Les glucocorticoïdes sont synthétisés dans les glandes surrénales, plus précisément au niveau de la zone fasciculée. La synthèse de cette hormone, comme toutes les hormones stéroïdiennes, est réalisée par des modifications enzymatiques apportées au noyau de cholestérol qui est emmagasiné sous forme estérifiée dans des vésicules lipidiques intracellulaires. L'ensemble des modifications enzymatiques amenant la formation des stéroïdes à partir du cholestérol est appelé stéroïdogénèse (Figure 1). La première modification est apportée par la desmolase (CYP11A1) qui permet la conversion du cholestérol en prégnénolone. La prégnénolone est ensuite transformée par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase II (3 $\beta$ -HSD II) et la 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17) pour former la 17-OH progestérone. Cette dernière est un substrat pour la 21-hydroxylase (CYP21A2) qui produit le 11-désoxycortisol. Finalement, le 11-désoxycortisol est



## **1.2 Régulation de la sécrétion**

Le cortex surrénalien, responsable de la synthèse des glucocorticoïdes, est régulé par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Figure 2). Ce système de régulation est un système classique de rétroaction négative de troisième ordre impliquant l'hormone de relâche de la corticotropine (CRH), une hormone hypophysaire nommée adénocorticotropine (ACTH), et les glucocorticoïdes (Binkley, 1995). Suite à un stimulus comme le stress, la CRH est sécrétée à partir des noyaux supraoptiques, paraventriculaires et arqués de l'hypothalamus, et elle permet la relâche de l'ACTH des cellules corticotrophes de l'hypophyse antérieure. Notons que la vasopressine stimule aussi la sécrétion de l'ACTH. L'ACTH se lie à ses récepteurs au niveau des zones fasciculée et réticulée des glandes surrénales et stimule une adénylyl cyclase responsable de l'accroissement de l'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc) cellulaire. Ce second messenger est responsable de l'activation d'une protéine kinase qui phosphoryle une hydrolase d'ester de cholestérol qui permet la libération du cholestérol des vésicules lipidiques. Ce cholestérol est ensuite converti en un glucocorticoïde par de multiples modifications enzymatiques puis relâché dans la circulation où il agira à différents niveaux (Binkley, 1995).

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est régulé par une rétroaction négative exercée par le cortisol sur la sécrétion de l'ACTH et de la CRH (Jacobson et Sapolsky, 1991). À l'état de repos, la relâche de la CRH, de l'ACTH et du cortisol se fait selon un cycle circadien. À un niveau basal, la principale fonction des glucocorticoïdes est de maintenir une glycémie normale et de prévenir une chute de pression artérielle.



**Figure 2 :** Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes. L'ACTH produite par l'hypophyse antérieure suite à la stimulation par la CRH, active la sécrétion des glucocorticoïdes au niveau des glandes surrénales. Les glucocorticoïdes exercent une rétroaction négative sur la sécrétion de l'ACTH et de la CRH au niveau de l'hypophyse antérieure et de l'hypothalamus respectivement (Wilson et *al.*, 1998).

### **1.3 Transport, métabolisme et excrétion**

Le cortisol circulant est lié à une protéine transporteuse appelée transcortine ou protéine de liaison des corticostéroïdes (CBG) qui est synthétisée au niveau du foie (Ganong, 1995). La concentration sanguine de cortisol varie selon un cycle circadien variant de 140-690  $\eta\text{mol/L}$  à 8 heures AM à 80-330  $\eta\text{mol/L}$  à 4 heures PM (Wilson et *al.*, 1998).

Le cortisol est métabolisé au niveau du foie. D'abord, la plupart du cortisol est réduit en dihydrocortisol et ensuite en tétrahydrocortisol lequel est conjugué à l'acide glucoronique pour être éliminé au niveau du rein. Dans le foie, mais aussi dans plusieurs tissus, l'enzyme  $11\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase ( $11\beta$ -HSD) converti le cortisol en cortisone (Ganong, 1995). La cortisone n'a que peu d'affinité pour les récepteurs des minéralocorticoïdes contrairement au cortisol qui a une affinité élevée. La  $11\beta$ -HSD permet donc d'éviter les effets minéralocorticoïdes par le cortisol.

### **1.4 Mécanisme d'action**

Le cytoplasme des cellules cibles des glucocorticoïdes possèdent des récepteurs spécifiques à ces stéroïdes. Lorsque non activé, chaque récepteur est lié à deux protéines « heat shock protein 90 kDa » (HSP 90). La liaison du stéroïde liposoluble avec son récepteur cytoplasmique permet la libération des protéines HSP 90 exposant une séquence importante du récepteur : le motif en doigt de zinc. Il y a ensuite translocation dans le

noyau et dimérisation du complexe hormone-récepteur (Wilson et *al.*, 1998). À ce niveau, le complexe peut agir de deux façons que l'on réfère aux mécanismes d'action de type I et type II (Bamberger et *al.*, 1996). Dans le mécanisme d'action de type I, le dimère se fixe à une région régulatrice du promoteur de gènes cibles en utilisant la région en doigt de zinc des récepteurs. Cette région régulatrice se nomme élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE). La liaison du dimère au GRE permet la régulation de la transcription de différents gènes en ARNm encodant différentes protéines. Ce mode d'action est en fait un modèle classique de l'action des stéroïdes sur leurs cellules cibles. Cependant, les mécanismes impliqués sont souvent bien plus complexes et ainsi un gène dépourvu de GRE peut quand même être régulé par les glucocorticoïdes, que l'on réfère selon le mécanisme d'action de type II. Par exemple, il a été très bien démontré que les glucocorticoïdes peuvent interagir avec plusieurs facteurs de transcription comme *c-jun* et *c-fos* qui sont les composants du complexe « activator protein 1 » (AP-1) et inhiber la synthèse de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (Cato et *al.*, 1996). Les interactions engendrées avec des facteurs de transcription peuvent être sous la forme protéine-protéine et ainsi indépendantes de la liaison à l'ADN ou elles peuvent être dépendantes de cette liaison (Beato et *al.*, 1989). La forme d'interaction engendrée dépend à la fois de la nature du facteur de transcription ainsi que des séquences régulatrices du gène impliqué.

Récemment, il a aussi été démontré que les glucocorticoïdes peuvent agir directement avec des enzymes impliquées dans différentes voies de signalisation cytoplasmiques et nucléaires pour moduler l'expression de gènes. Par exemple, les glucocorticoïdes inhibent l'activation d'une CaM/Kinase chez les lymphocytes via

l'activation d'une sérine/thréonine phosphatase (1 ou 2A) (Paliogianni et *al.*, 1995) et inhibent l'activité d'une sérine/thréonine kinase (pp70<sup>s6k</sup>) chez les lymphocytes T (Monfar et *al.*, 1996).

## **1.5 Rôles**

Les hormones stéroïdiennes sont des constituants essentiels dans le système de communication intercellulaire qui maintient l'homéostasie dans les organismes supérieurs. Les glucocorticoïdes, une sous-classe majeure des hormones stéroïdiennes, modulent un grand nombre de fonctions cardio-vasculaires, métaboliques et immunitaires.

### **1.5.1 Système cardio-vasculaire**

Les glucocorticoïdes agissent sur le cœur et les vaisseaux sanguins pour moduler un tonus vasculaire. Pour ce faire, ils influencent la réactivité vasculaire à divers agents vasoactifs ainsi que la sécrétion de certains de ces agents. De plus, les glucocorticoïdes influencent légèrement les électrolytes et la balance en eau. Ils provoquent une faible rétention du sodium et de l'eau, diminuent la concentration de potassium et augmentent la filtration glomérulaire. Une partie de ces effets est causée par leur liaison aux récepteurs des minéralocorticoïdes (Greenspan et Strewler, 1997). En excès, les glucocorticoïdes causent l'hypertension, tel que discuté plus loin. On observe également une augmentation de l'athérosclérose (Kalbak, 1972) et de l'hypertrophie cardiaque (Whitworth et *al.*, 1990 ; Kurowski et *al.*, 1984).



### 1. 5. 2 Métabolisme intermédiaire

Le nom glucocorticoïde dérive de l'effet de ce stéroïde sur la synthèse du glucose et du glycogène. Les glucocorticoïdes affectent le métabolisme intermédiaire par l'altération d'enzymes importantes principalement au niveau du foie, des muscles et des tissus graisseux. D'abord, les glucocorticoïdes accroissent la gluconéogénèse dans les cellules hépatiques et augmentent la formation de glycogène. De façon concomitante, les glucocorticoïdes augmentent la disponibilité de substrats dérivés de protéines et de lipides, d'une part en diminuant le captage des acides aminés par les cellules et en diminuant la synthèse protéique et d'autre part en augmentant la lipolyse. Les glucocorticoïdes augmentent d'autant plus le glucose sanguin en inhibant le captage du glucose par les cellules musculaires et les tissus graisseux (Binkley, 1995).

### 1. 5. 3 Système immunitaire

Les glucocorticoïdes sont très connus pour leur rôle d'anti-inflammatoires. La réaction est complexe et implique plus d'une cinquantaine de facteurs. Le rôle général des glucocorticoïdes est d'inhiber la majorité des ces facteurs, autant au niveau de leur synthèse qu'au niveau de leurs actions. De plus, ils augmentent l'activité et le mouvement des leucocytes. Particulièrement, ils accroissent le nombre de leucocytes polymorphonucléaires (PMN) en permettant leur relâche à partir de la moelle épinière jusqu'au sang. Finalement, ils stimulent la migration des cellules inflammatoires (PMNs, monocytes, lymphocytes) vers les sites d'inflammation. Leur habileté à supprimer l'inflammation rend les glucocorticoïdes très utiles dans le traitement des malaises où

l'inflammation est impliquée : infections, arthrite rhumatoïde, allergies, rejets de transplants, et asthmes (Binkley, 1995). Cependant, l'utilisation de glucocorticoïdes comme anti-inflammatoires provoque des effets secondaires dont les symptômes sont semblables à ceux d'une maladie causée par un excès de production de cortisol : le syndrome de Cushing.

#### 1. 5. 4 Autres

Les poumons, la peau, les os, les intestins et le système nerveux central sont aussi des cibles des glucocorticoïdes. D'abord, ces stéroïdes sont importants dans le développement pulmonaire des fœtus. Ensuite, un excès de glucocorticoïdes causera une fragilisation de la peau causée par une perte de collagène et de tissus conjonctifs. La formation des os est aussi inhibée par un excès de glucocorticoïdes. Ceux-ci diminuent l'absorption du calcium par les intestins et accroissent la perte du calcium dans l'urine. Les glucocorticoïdes favorisent la croissance et le développement chez les enfants à moins qu'ils ne soient en excès où là, ils inhibent ces fonctions (Binkley, 1995). Au niveau du système nerveux central, le rôle physiologique précis des glucocorticoïdes n'est pas encore connu mais on sait qu'un excès ou une déficience de ces stéroïdes est à l'origine de l'altération du comportement et des fonctions cognitives (Greenspan et Strewler, 1997).

## **2. LES GLUCOCORTICOÏDES ET L'HYPERTENSION**

### **2.1 Hypertension**

L'hypertension afflige plus de 10% de la population mondiale et est une cause importante de mortalité. Elle se caractérise par une élévation soutenue de la pression artérielle et celle-ci est déterminée par trois facteurs importants : la résistance périphérique, le débit cardiaque et le volume plasmatique. Une élévation du débit cardiaque et du volume plasmatique peut être à l'origine d'hypertension mais une hypertension soutenue est habituellement causée par une augmentation de la résistance périphérique (Ganong, 1995). Le muscle lisse vasculaire est le plus important régulateur de la résistance périphérique.

L'hypertension peut être engendrée par de nombreux facteurs. Par exemple, des maladies rénales (glomérulonéphrites, pyélonéphrites), des tumeurs au niveau des cellules juxtaglomérulaires, des tumeurs au niveau de la médullo-surrénale ou des maladies du cortex surrénalien qui se traduisent par une hypersécrétion de glucocorticoïdes ou une hypersécrétion de minéralocorticoïdes (Ganong, 1995).

Cependant, la majorité des causes d'hypertension sont inconnues. Elles représentent 90% des cas d'hypertension que l'on nomme hypertension essentielle.

## **2.2 Hypertension induite par les glucocorticoïdes**

Un excès de glucocorticoïdes chez l'homme peut survenir naturellement comme dans le cas du syndrome de Cushing ou, le plus souvent, provenir d'une source extérieure. Les conséquences d'un excès en glucocorticoïdes sont bien connues : obésité qui est prédominante au niveau du tronc et membres minces, ostéoporose, intolérance au glucose et fréquent cas de diabète mellitus, cataractes, calculs rénaux, hypertrophie du ventricule gauche, et bien d'autres. Environ le deux-tiers des cas de syndrome de Cushing sont dus à un excès de sécrétion d'ACTH (Binkley, 1995).

En plus de toutes ces conséquences, une hypertension se développe chez près de 80% de ces patients. D'ailleurs, la mortalité suite aux problèmes cardio-vasculaires chez les patients atteints du syndrome de Cushing est plus de quatre fois celle de la population en générale (Whitworth, 1994 ; Greenspan et Strewler, 1997). Même après un traitement efficace, la morbidité et la mortalité demeurent très élevées par rapport à la population en générale puisque les effets néfastes au niveau du système cardio-vasculaire, comme l'athérosclérose, sont déjà implantés (Grunfeld, 1990). Inversement, une déficience en glucocorticoïdes comme dans le cas de la maladie d'Addison est accompagnée d'une baisse de pression artérielle. Les glucocorticoïdes ont donc un rôle très important à jouer dans le maintien de l'homéostasie du système cardio-vasculaire.

On peut reproduire l'hypertension causée par le syndrome de Cushing expérimentalement en administrant de façon exogène des glucocorticoïdes chez l'humain ou des modèles animaux. Ce type d'hypertension se caractérise par une augmentation rapide de la pression artérielle dès le premier jour de l'administration (Okuno et *al.*, 1981 ;

Clarke et *al.*, 1968 ; Elijovich et *al.*, 1980 ; Haack et *al.*, 1977; Knowlton et *al.*, 1952 ; Krakoff et *al.*, 1975 ; Ogawa et *al.*, 1965 ; Whitworth et *al.*, 1979). L'administration d'un antagoniste des récepteurs des glucocorticoïdes (RU 38486) renverse l'hypertension induite par les glucocorticoïdes (Grunfeld et *al.*, 1987).

## **2. 3 Hypertension induite par les glucocorticoïdes versus hypertension induite par les minéralocorticoïdes**

L'hypertension induite par les minéralocorticoïdes est causée par une augmentation de la rétention du sodium et de la réabsorption de l'eau au niveau rénal ainsi qu'une augmentation de l'appétit sodé au niveau central. Ceci cause une augmentation du volume plasmatique à l'origine de la hausse de la pression artérielle. Cette augmentation de la pression artérielle est relativement lente (3 à 4 jours) et nécessite une diète supplémentée en sel (Yagil et *al.*, 1986 ; Whitworth et *al.*, 1979). De son côté, l'hypertension induite par les glucocorticoïdes est très rapide (moins de 24 heures) (Okuno et *al.*, 1981 ; Clarke et *al.*, 1968 ; Elijovich et *al.*, 1980 ; Haack et *al.*, 1977; Knowlton et *al.*, 1952 ; Krakoff et *al.*, 1975 ; Ogawa et *al.*, 1965 ; Whitworth et *al.*, 1979). Même si les glucocorticoïdes ont une grande affinité pour les récepteurs des minéralocorticoïdes et qu'ils provoquent une légère rétention du sodium, il a été démontré qu'il est peu probable que ce mécanisme soit à l'origine de l'induction de la pression artérielle par ces stéroïdes (Okuno et *al.*, 1981). L'augmentation de la résistance périphérique est la cause la plus plausible (Yagil et Krakoff, 1988 ; Sudhir et *al.*, 1989 ; Saruta et *al.*, 1986 ; Grundfeld et Eloy, 1987). Ceci sera discuté plus loin.

## **2. 4 Les glucocorticoïdes dans l'hypertension essentielle**

Quatre-vingts pour-cent des patients atteints du syndrome de Cushing sont hypertendus (Grünfeld, 1990 ; Walker et *al.*, 1995). Evidemment, le cortisol fut un des premiers facteurs hypertensiogéniques à être étudié dans l'hypertension essentielle. Cependant, aucune anomalie ne pouvait être détectée dans la concentration de cortisol sanguin et l'attention fut portée sur d'autres facteurs. Depuis quelques années, l'intérêt pour le cortisol comme cause éventuelle d'hypertension essentielle a refait surface. Plusieurs sont à explorer la possibilité que le cortisol puisse être impliqué dans l'hypertension essentielle non par un changement dans la concentration de l'hormone circulante mais par une augmentation de la sensibilité tissulaire à ce stéroïde. Une augmentation de la sensibilité tissulaire pourrait être causée par des mutations au niveau des récepteurs aux glucocorticoïdes ou encore un mauvais fonctionnement de la 11 $\beta$ -HSD qui a pour rôle d'inactiver le cortisol dans les tissus (Walker et *al.*, 1996). Donc, les glucocorticoïdes sont peut-être beaucoup plus importants comme cause d'hypertension essentielle qu'on ne le croyait auparavant.

## **2. 5 Effets hypertenseurs des glucocorticoïdes**

Un excès en glucocorticoïdes cause une augmentation rapide (24h.) de la pression artérielle (Okuno et *al.*, 1981 ; Clarke et *al.*, 1968 ; Elijovich et *al.*, 1980 ; Haack et *al.*, 1977 ; Knowlton et *al.*, 1952 ; Krakoff et *al.*, 1975 ; Ogawa et *al.*, 1965 ; Whitworth et *al.*, 1979). Tel que mentionné précédemment, il est peu probable que la rétention sodique soit responsable de l'induction de la pression artérielle par ces stéroïdes (Okuno et *al.*, 1981). L'augmentation de la résistance périphérique semble être le facteur le plus important dans cette induction (Yagil et Krakoff, 1988 ; Sudhir et *al.*, 1989 ; Saruta et *al.*, 1986 ; Grundfeld et Eloy, 1987). Les mécanismes responsables de l'augmentation de la résistance périphérique par les glucocorticoïdes peuvent être classés en trois groupes : augmentation de la réactivité vasculaire, inhibition de production d'agents vasodilatateurs et augmentation de production d'agents vasopresseurs.

### **2. 5. 1 Augmentation de la réactivité vasculaire**

L'angiotensine II, la noradrénaline ainsi que la vasopressine sont de puissants agents vasopresseurs impliqués dans la modulation du tonus vasculaire. Une augmentation de la réactivité vasculaire à l'angiotensine II est observée *in vivo* chez le rat et l'humain suite à l'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, (Grünfeld et Eloy, 1987 ; Whitworth, 1986 ; Pirpiris et *al.*, 1992) et chez les individus souffrant du syndrome de Cushing (Saruta et *al.*, 1986). Il a été démontré *in vitro* que le nombre de

récepteurs ATI était augmenté dans les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) en culture (Provencher et *al.*, 1995). Une augmentation de la réactivité vasculaire à la noradrénaline dans le syndrome de Cushing (Mendlowitz et *al.*, 1958) ainsi que chez des modèles animaux hypertendus par les glucocorticoïdes a aussi été démontrée. Les glucocorticoïdes augmentent également le nombre et l'expression du récepteur de la vasopressine dans les CMLV en culture (Provencher et Chisholm, 1996). Ce mécanisme de la modulation de la réactivité vasculaire est un mécanisme qu'on croit très important dans l'induction de l'hypertension par les glucocorticoïdes.

### 2. 5. 2 Inhibition de production de vasodilatateurs

La synthèse de l'oxyde nitrique et des prostacyclines dans la paroi vasculaire sont des éléments importants dans la relaxation des vaisseaux sanguins et les glucocorticoïdes ont pour effet d'inhiber leur synthèse. D'abord, les glucocorticoïdes inhibent la synthèse de l'oxyde nitrique synthase inductible (NOSi) qui permet directement la synthèse de l'oxyde nitrique (Kleinert et *al.*, 1996). Les glucocorticoïdes empêche également la formation des prostacyclines induite par différents agents. Pour ce faire, ils inhibent indirectement la synthèse d'enzymes importantes pour leur formation : la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Goppelt-Struebe, 1995) et la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Croxtall et *al.*, 1996). Les mécanismes d'inhibition impliqués sont encore obscurs et dépendent du stimuli étudié (Goppelt-Struebe, 1997). Une implication de la lipocortine (annexine) est un mécanisme envisagé.



### 2. 5. 3 Augmentation de production de vasopresseurs

#### 2. 5. 3. 1 Angiotensine II

Les évidences apportées jusqu'à maintenant indiquent que le système rénine-angiotensine II joue probablement un rôle accessoire dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes augmentent la synthèse de l'angiotensinogène qui est le précurseur de l'angiotensine II (Walker et *al.*, 1993). Ils stimulent également la synthèse de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II (ACE ; Whitworth et *al.*, 1994). Ces deux facteurs peuvent contribuer à l'augmentation de la synthèse de l'angiotensine II.

#### 2. 5. 3. 2 Endothéline-1

Peu d'attention a été porté sur ce puissant agent vasopresseur récemment découvert quant à son implication dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes. Cependant, il a été démontré que chez les CMLV en culture, cellules directement responsables des variations du tonus vasculaire, les glucocorticoïdes augmentent la synthèse de l'endothéline-1 (Kato et *al.*, 1995; Kanse et *al.*, 1991; Roubert et *al.*, 1990). Cette augmentation a aussi été démontrée chez une lignée de cellules endothéliales humaines (HUVEC ; Huang et *al.*, 1995), mais pas dans des cellules endothéliales bovines (Kanse et *al.*, 1991). Les glucocorticoïdes diminuent cependant le récepteur ET<sub>A</sub> de l'endothéline-1

dans les CMLV. Les études n'en sont donc qu'à leur début et le rôle possible de l'endothéline-1 dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes reste encore à déterminer.

Diminuent	Augmentent
Synthèse des prostacyclines (Empêche la synthèse de la COX-2 et de la PLA <sub>2</sub> )	Synthèse et sécrétion de ET-1 dans les CMLV
Synthèse de l'oxyde nitrique (Inhibe la synthèse de la NOSi)	Synthèse de l'angiotensinogène ainsi que de la ACE
Les récepteurs ET <sub>A</sub> au niveau des CMLV	Réactivité vasculaire à divers agents vasoactifs (norépinéphrine, angiotensine II, vasopressine)

**Table 1.** Actions des glucocorticoïdes pouvant affecter la pression artérielle

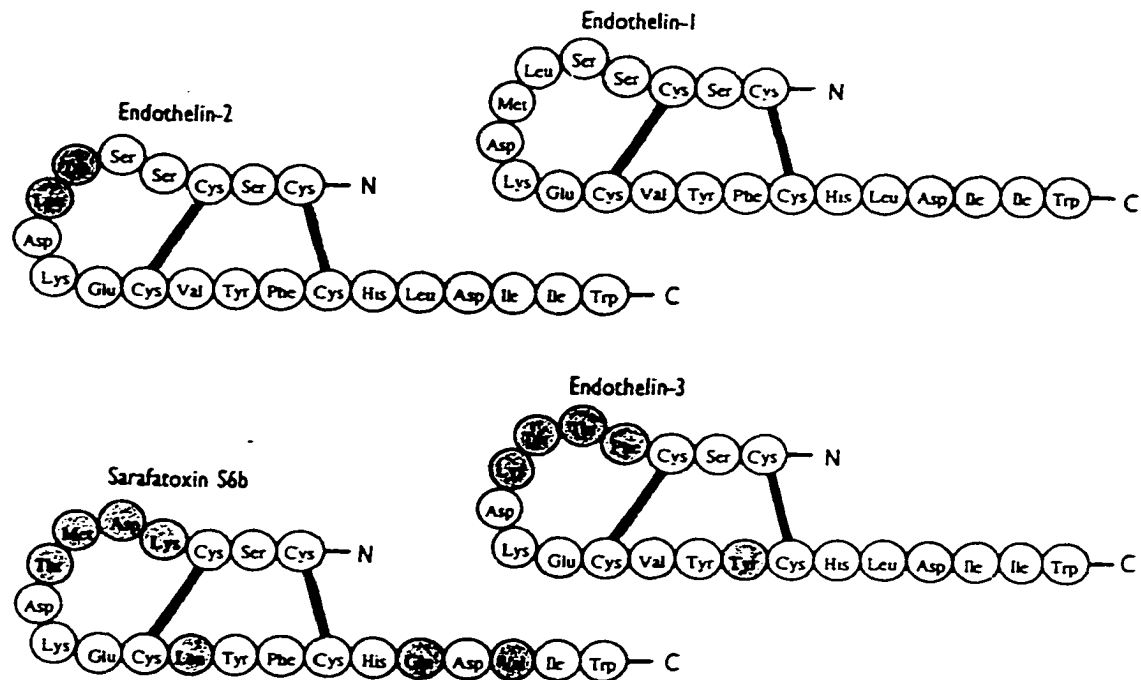
### 3. LES ENDOTHÉLINES

L'endothéline fut initialement découverte dans le milieu de culture de cellules endothéliales aortiques de porcs (endothéline-1 ; Yanagisawa et *al.*, 1988). Des expériences subséquentes ont révélé que l'endothéline-1 appartient à une famille de gènes de peptides homologues. L'intérêt pour ce peptide s'est accentué suite à la découverte de six peptides (sarafotoxines) pratiquement identiques dans le venin de *Atractaspis engaddensis* par Kloog et *al.* en 1988. Les sarafotoxines agissent chez les mammifères en interagissant avec les récepteurs de l'endothéline pour causer une constriction intense des vaisseaux habituellement suivi d'un arrêt cardiaque. Le haut niveau d'homologie de séquences et d'activité entre les sarafotoxines et l'endothéline suggère que ces peptides ont une origine évolutive commune.

La famille des endothélines comprend trois isoformes nommées : endothéline-1 (ET-1), endothéline-2 (ET-2), endothéline-3 (ET-3 ; Itoh et *al.*, 1988 ; Yanagisawa et *al.*, 1988 ; Inoue et *al.*, 1989). Ces trois isoformes sont exprimées dans plusieurs tissus dans des proportions différentes : ET-1 est exprimée non seulement au niveau vasculaire mais aussi dans le cerveau, les reins et les poumons entre autres (Sakurai et *al.*, 1991) ; ET-2 et ET-3 sont plus abondantes dans les intestins, les glandes surrénales et le cerveau (Bloch et *al.*, 1989 ; Ohkubo et *al.*, 1990 ; Shiba et *al.*, 1992). Dans l'hypertension, ET-1 est de loin l'isoforme la plus étudiée.

### 3.1 Structure et biosynthèse

Les trois isoformes de l'endothéline possèdent des structures similaires de 21 acides aminés incluant quatre résidus cystéines formant deux ponts dissulfures intramoléculaires (Figure 3). Les trois isoformes sont encodées par trois gènes distincts (Inoue et *al.*, 1989). De façon similaire à d'autres hormones ou neurotransmetteurs, les isoformes de l'endothéline sont formées à partir de la maturation protéolytique de prohormones. L'ARNm du peptide précurseur a une courte demi-vie d'environ 15 minutes (Yanagisawa et *al.*, 1989). Cet ARNm encode pour les préproendothélines qui sont de larges peptides d'environ 200 acides aminés chez lesquels les premiers 20–25 résidus constituent la séquence signal pour la translocation des polypeptides vers le réticulum endoplasmique (Itoh et *al.*, 1988). Le clivage de cette séquence signal génère un peptide nommé pro-endothéline. Une endopeptidase (une famille de protéases  $\text{Ca}^{++}$ -dépendantes dont fait partie la furine ; Laporte et *al.*, 1993 ; Kido et *al.*, 1998) procède au clivage de ce précurseur sur deux motifs Lys-Arg pour laisser un peptide de 38 ou 39 acides aminés, nommé big endothéline, ainsi que les deux extrémités  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  terminales (Yanagisawa et *al.*, 1988 ; Inoue et *al.*, 1989). L'étape suivante qui génère les endothélines matures nécessite une enzyme de conversion de l'endothéline (ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline) qui reconnaît un site de clivage unique entre les résidus Trp21-Val22 de la big endothéline. L'endothéline mature de 21 acides aminés est ainsi générée. Les séquences nucléotidiques encodant pour le peptide mature sont très conservées entre les trois isoformes de l'endothéline (Inoue et *al.*, 1989).



**Figure 3 :** Séquence en acides aminés des trois membres de la famille des endothélines. Les cercles ombrés représentent les acides aminés différents de l'endothéline-1 (Haynes et Webb, 1993)

## 3. 2 Leurs récepteurs

Après la découverte de l'endothéline, plusieurs auteurs ont décrit une variété d'actions pharmacologiques de l'endothéline non seulement au niveau du système vasculaire mais aussi au niveau d'autres systèmes (Landan et *al.*, 1991). Des études de liaisons avec les trois isopeptides ont révélé l'existence de plus d'un type de site de liaison avec des affinités différentes. Par la suite, deux différentes séquences d'ADNc des récepteurs à l'endothéline ont été démontrées et appelées ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Un troisième sous-types (ET<sub>C</sub>) a été découvert chez *Xenopus laevis* mais aucune isoforme semblable n'a été détectée chez les mammifères (Karne et *al.*, 1993).

### 3. 2. 1 Le récepteur ET<sub>A</sub>

Le récepteur ET<sub>A</sub> a une grande affinité pour ET-1 et ET-2 mais très peu pour ET-3 (Arai et *al.*, 1990). Ce récepteur est retrouvé dans plusieurs tissus en particulier au niveau des CMLV et des reins (Haynes et Webb, 1993). Dans les CMLV, ET<sub>A</sub> médie une contraction des vaisseaux. Ces récepteurs sont également impliqués dans l'action mitogénique de l'endothéline-1 dans ces mêmes cellules (Haynes et Webb, 1993)

### 3. 2. 2 Le récepteur ET<sub>B</sub>

Le récepteur ET<sub>B</sub> possède une affinité équivalente pour les trois isoformes de l'endothéline (Sakurai et *al.*, 1990). Ici également, il existe une diversité d'actions ayant une spécificité tissulaire. Ils sont retrouvés dans plusieurs tissus entre autre au niveau

vasculaire (Haynes et Webb, 1993). L'activation de ET<sub>B</sub> par l'endothéline dans les cellules endothéliales amène l'activation de l'oxyde nitrique synthase (NOS ; Rubanyi et *al.*, 1994). La NOS convertit la L-arginine et une molécule d'O<sub>2</sub> en L-citrulline et oxyde nitrique (NO ; Moncada et *al.*, 1991 ; Nathan, 1992), ce dernier étant un agent vasorelaxant. L'activation de la COX-2 et de l'activité PLA<sub>2</sub> (Rubanyi et *al.*, 1994) par la liaison de ET-1 sur ET<sub>B</sub> amène de son côté la synthèse des prostacyclines (de Nucci et *al.*, 1988 ; Thiemermann et *al.*, 1989), qui sont aussi des agents vasorelaxants agissant au niveau de CMLV.

La présence de récepteurs ET<sub>B</sub> a été observée dans le muscle lisse vasculaire chez plusieurs espèces animales (lapin, rat, porc, chien) et des évidences portent à croire que ceux-ci auraient un rôle de vasoconstriction au niveau de ce tissu, plus particulièrement au niveau des petites artères et des veines (Moreland et *al.*, 1992 ; Sumner et *al.*, 1992 ; Moreland et *al.*, 1994 ; Sudjarwo et *al.*, 1994). Cependant, la contribution de ces récepteurs à la vasoconstriction est variable et semble dépendre beaucoup de l'espèce et du vaisseau étudié (Haynes et *al.*, 1995 ; Adner et *al.*, 1998, Davenport et Maguire, 1994). Chez l'humain, la présence des récepteurs ET<sub>B</sub> est observée dans le muscle lisse vasculaire, entre autres au niveau de l'aorte, des artères pulmonaires et coronaires ainsi que dans des vaisseaux de résistance (Davenport et *al.*, 1993). L'effet vasoconstricteur est également observé dans certains des vaisseaux étudiés (Haynes et *al.*, 1995 ; Davenport et Maguire, 1994). Il n'en demeure pas moins que chez cette espèce, plus de 95% des récepteurs sur les CMLV sont de type ET<sub>A</sub>.

### 3. 2. 3 Voie de signalisation

Les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> sont des protéines à sept domaines transmembranaires. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G. L'activation de ces récepteurs résulte en la génération de plusieurs seconds messagers intracellulaires comme les inositols phosphates (IP<sub>3</sub>), le diacylglycérol (DAG), le calcium intracellulaire, l'acide arachidonique et les nucléotides cycliques (AMPc, GMPc). Ces seconds messagers activent des enzymes comme les kinases et les phosphatases, lesquelles à leur tour phosphorylent ou déphosphorylent des protéines clefs dans la voie de signalisation, menant à une grande diversité de réponses biologiques.

L'activation de l'adénylyl cyclase par Gq chez les CMLV résulte en l'activation de la phospholipase C et la formation de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), amenant la mobilisation rapide du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui est à l'origine de la contraction musculaire (Eguchi et *al.*, 1992).

Il a également été démontré que l'endothéline-1 exerçait des effets mitogéniques sur les CMLV suggéré par l'accroissement rapide des niveaux d'ARNm de *c-fos* et *c-myc* et de la synthèse d'ADN (Komuro et *al.*, 1988). Des évidences suggèrent que la voie de signalisation de l'endothéline-1 amenant ces effets mitogéniques partagerait des effecteurs avec la voie de signalisation des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs tyrosine kinase : par exemple, des effecteurs comme Ras, c-Raf-1 et les MAP kinases.

L'activation de la protéine kinase C, de la phospholipase D et de la PLA<sub>2</sub> n'est pas non plus négligeable et contribue aux différents effets à court et à long terme de l'activation des récepteurs par l'endothéline (Simonson et *al.* 1990).



### 3. 2. 4 Biologie moléculaire des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>

Les gènes des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> s'étendent sur 40 et 24 Kb d'ADN respectivement. Les protéines de ces deux récepteurs sont d'environ 45 à 50 kDa. Il n'y a que 50% d'homologie entre les deux récepteurs au niveau de la séquence d'acides aminés. Les séquences promotrices en 5' ont été clonées et sont caractérisées par des sites de liaison Sp-1 ; GATA ; « acute phase reactant regulatory element » (APRE). Malgré ces similitudes dans les séquences régulatrices, l'expression des deux gènes est très différente d'un tissu à l'autre. Par exemple, le récepteur ET<sub>B</sub> est abondant dans les cellules endothéliales et le récepteur ET<sub>A</sub> domine chez les CMLV.

### 3. 2. 5 Régulation des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>

L'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> est sous le rétrocontrôle négatif de l'endothéline dans plusieurs types cellulaires (Hirata et *al.*, 1988). Ce rétrocontrôle est rapide et soutenu sur une période de plusieurs heures. Plusieurs autres facteurs sont impliqués dans la régulation des récepteurs de l'endothéline : l'AMPc (Nishimura et *al.*, 1992) ; l'oxyde nitrique (Redmond et *al.*, 1996) ; le « fibroblast growth factor » (FGF) (Cristiani et *al.*, 1994) ; le « transforming growth factor  $\beta$  » (TGF $\beta$ ) (Cristiani et *al.*, 1994) ; l'angiotensine II (Roubert et *al.*, 1989) ; la cyclosporine (Iwasaki et *al.*, 1994) ; les variations des forces mécaniques dues au flot sanguin (Barber et *al.*, 1996) ; les glucocorticoïdes (Provencher et *al.*, 1995 ; Nambi et *al.*, 1992 ; Roubert et *al.*, 1993 ; Kato et *al.*, 1995).

## **4. L'ENDOTHÉLINE-1**

### **4. 1 Biologie moléculaire du gène de la préproendothéline-1**

Le gène de la préproendothéline-1 (ppET-1) a été cloné et caractérisé. Chez l'humain, le gène est localisé sur le chromosome 6 et est composé de 5 exons flanqués des régions 5' et 3' et s'étend sur environ 6,8 Kb d'ADN génomique. La région 3' non-codante du gène de la ppET-1 contient trois motifs AUUUA ainsi que des motifs AUn (Inoue et *al.*, 1989 ; Bloch et *al.*, 1989). Ces motifs sont impliqués dans la déstabilisation traduction-dépendante des ARNm (Shaw et *al.*, 1986). Ceci explique la courte demi-vie du messager de la ppET-1 et la superinduction observée en présence de cycloheximide (Inoue et *al.*, 1989).

Le gène de la ppET-1 humain comprend plusieurs séquences régulatrices incluant les boîtes TATAA et CATT, des séquences consensus : « nuclear factor-1 » (NF-1) (Inoue et *al.*, 1989 ; Bloch et *al.*, 1989) ; « acute phase reactant regulatory element » (APRE) (Inoue et *al.*, 1989 ; Bloch et *al.*, 1989) ; « activator protein-1 » (AP-1) (Inoue et *al.*, 1989 ; Bloch et *al.*, 1989 ; Lee et *al.*, 1991) ; GATA (Lee et *al.*, 1990 ; Wilson et *al.*, 1990). Le promoteur du gène de la ppET-1 a récemment été cloné chez le rat (Paul et *al.*, 1995). L'homologie entre les séquences promotrices du gène humain et de rat est de 85% (Paul et *al.*, 1995).

## **4. 2 Régulation de l'endothéline-1 dans la paroi vasculaire**

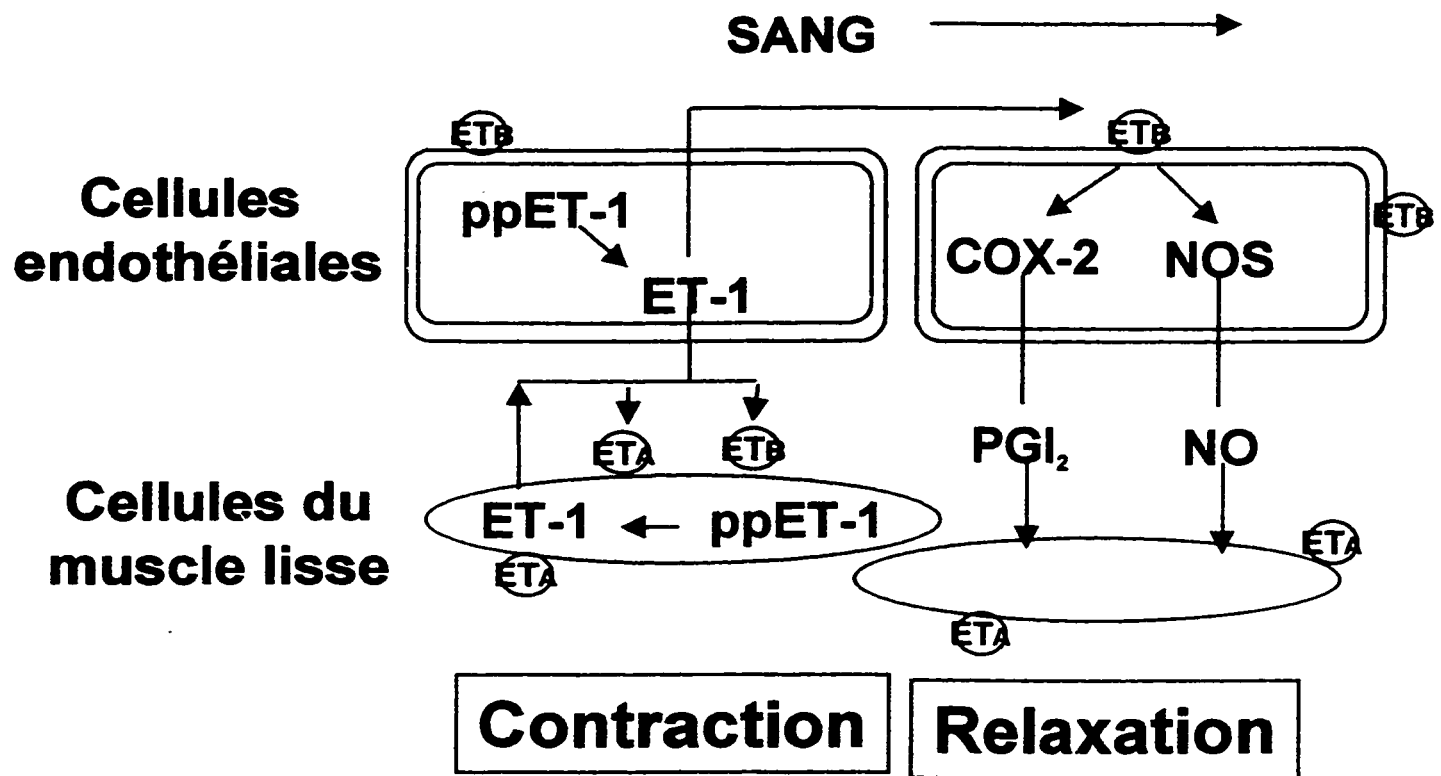
Plusieurs évidences suggèrent que l'endothéline-1 agit comme une hormone locale et non comme une hormone circulante. Une évidence importante est que le niveau d'endothéline-1 plasmatique se situe de 0.5 à 5.0 pmol/L (Ando et *al.*, 1989 ; Cernacek et Stewart, 1989 ; Heublein et *al.*, 1989 ; Miyauchi et *al.*, 1989 ; Nakamura et *al.*, 1990 ; Saito et *al.*, 1989a ; Saito et *al.*, 1989b) lequel est sous la concentration estimée nécessaire pour activer les récepteurs à l'endothéline. Cette hormone est sécrétée principalement au niveau des cellules endothéliales et des CMLV et agit de façon autocrine sur ces mêmes cellules. L'endothéline-1 plasmatique ne serait donc qu'un débordement de l'hormone locale.

Les CMLV et les cellules endothéliales sont deux types cellulaires particulièrement importants dans les variations de pression artérielle. Les CMLV parce qu'elles ont la propriété de contraction essentielle aux vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales parce qu'elles possèdent l'habileté de réguler directement le muscle lisse par la relâche de substances vasoactives incluant l'oxyde nitrique, les prostacyclines et bien sûr l'endothéline-1 (Yanagisawa et *al.*, 1988).

L'endothéline-1 synthétisée dans les cellules endothéliales est relâchée à 80% du côté basal des cellules et agit sur la couche sous-jacente du muscle lisse pour induire une contraction rapide et soutenue via les récepteurs ET<sub>A</sub> (Yanagisawa et *al.*, 1988a ; Yanagisawa et *al.*, 1988b ; de Nucci et *al.*, 1988 ; Hom et *al.*, 1992). Les quelques récepteurs ET<sub>B</sub> peuvent aussi contribuer à la contraction des CMLV mais cet effet est probablement plus important au niveau rénal (Cristol et *al.*, 1993 ; Pollock et Opgenorth, 1993). Les CMLV peuvent également produire l'endothéline-1 et il a été démontré qu'elles peuvent autoréguler leur contraction (Hahn et *al.*, 1990 ; Alberts et *al.*, 1994). Une certaine proportion de l'endothéline-1 produite par les cellules peut également se lier aux récepteurs ET<sub>B</sub> des cellules endothéliales et ceci amène l'activation de la NOS, de la COX-2 et de la PLA<sub>2</sub> et ainsi la relâche de l'oxyde nitrique et des prostacyclines qui agissent sur les CMLV pour amener la relaxation des vaisseaux. Ceci explique la vasorelaxation transitoire observée *in vivo* suite à l'administration de l'endothéline-1 (Yanagisawa et *al.*, 1988a ; Yanagisawa et *al.*, 1988b ; de Nucci et *al.*, 1988 ; Hom et *al.*, 1992). La relation complexe entre les deux types cellulaires de la paroi vasculaire est illustrée à la figure 4.

L'expression du gène de la ppET-1 ainsi que de la sécrétion du peptide ET-1 sont régulées par plusieurs facteurs. D'abord, chez les cellules endothéliales elles sont stimulées par les facteurs de croissance et les cytokines (Yanagisawa et *al.*, 1988a ; Emori et *al.*, 1992 ; Kitamura et *al.*, 1989 ; Kitazumi et Tasaka, 1992 ; Marsden et Brenner, 1992 ; Oliver et *al.*, 1991 ; Yoshizumi et *al.*, 1990 ; Kurihara et *al.*, 1989) ; les substances vasoactives (Emori et *al.*, 1991 ; Marsden et *al.*, 1991 ; Inoue et *al.*, 1989) les lipoprotéines de faible densité (LDL) (Boulanger et *al.*, 1992) ; une diminution de la

pression artérielle en oxygène (Kourembanas et *al.*, 1991) ; une diminution des forces mécaniques dues au flot sanguin (Yoshizumi et *al.*, 1989) ; le calcium (Yanagisawa et Masaki, 1989) ; la thrombine (Schini et *al.*, 1989), les esters de phorbol (Inoue et *al.*, 1989). De plus, l'expression de la ppET-1 et la synthèse de l'endothéline-1 augmentent suite à une chirurgie, un infarctus du myocarde et autres stress (Miyachi et *al.*, 1989). Par contre, le peptide natriurétique de l'oreillette (ANP) et l'oxide nitrique diminuent l'expression de la ppET-1 (Boulanger et *al.*, 1990 ; Tasaka et *al.*, 1994). Une augmentation des forces mécaniques dues au flot sanguin fait de même (Malek et Izumo, 1992 ; Sharefkin et *al.*, 1991). Chez les CMLV maintenant, l'expression et la sécrétion de l'endothéline-1 sont stimulées par le TGF $\beta$  (Resink et *al.*, 1990), le « platelet derived growth factor » (PDGF ; Hahn et *al.*, 1990), l'angiotensine (Resink et *al.*, 1990), la vasopressine (Resink et *al.*, 1990) et l'endothéline-1 (Hahn et *al.*, 1990) et diminuées par l'oxide nitrique (Hahn et *al.*, 1990), les prostacyclines (Hahn et *al.*, 1990), le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP ; Kanse et *al.*, 1991) et le peptide vasoactif intestinal (VIP ; Kanse et *al.*, 1991). La synthèse de l'endothéline-1 est aussi augmentée par les glucocorticoïdes (Kato et *al.*, 1995 ; Kanse et *al.*, 1991 ; Roubert et *al.*, 1990). Ceci sera discuté dans un chapitre ultérieur.



**Figure 4 :** Régulation de l'endothéline-1 dans la paroi vasculaire.

## **4.3 Actions biologiques de l'endothéline-1**

### **4.3.1 Régulateur de la pression artérielle**

Le rôle de l'endothéline dans la régulation de la pression artérielle a d'abord été mis en évidence par l'administration intraveineuse de l'endothéline-1. Suite à cette injection, on remarque d'abord un effet dépresseur transitoire suivi d'une augmentation importante de la pression artérielle (Yanagisawa et *al.*, 1988 ; Masaki, 1993). L'effet dépresseur est plus évident lorsque la dose d'endothéline-1 est faible, et est pratiquement absente lorsqu'une forte dose est injectée (Miyauchi et *al.*, 1989). L'action de l'endothéline-1 administrée de façon intraveineuse serait donc d'abord de stimuler l'endothélium du côté luminal sur les récepteurs  $ET_{B1}$  et d'induire la relâche des facteurs relaxants (oxyde nitrique, prostacyclines) permettant la dilatation des vaisseaux. Ensuite, l'endothéline-1 traverserait l'endothélium pour aller stimuler le muscle lisse sur les récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$  et permettre la vasoconstriction. L'endothéline-1 agit donc à la fois comme un vasodilatateur et un vasopresseur. On s'entend généralement pour dire maintenant qu'à une dose physiologique, l'endothéline-1 agit comme vasodilatateur et à dose plus élevée, comme un vasopresseur (Mateo et De Artinano, 1997).

#### 4. 3. 2 Effets cardiaques

L'endothéline-1 a d'importants effets biologiques dans les tissus cardiaques. L'endothéline-1 stimule la contraction d'artères coronariennes isolées (Yanagisawa et *al.*, 1988a,b) et a des effets inotropiques et chronotropiques positifs dans l'oreillette et les ventricules isolés (Ishikawa et *al.*, 1988a,b ; Yanagisawa et *al.*, 1988b ; Moravec et *al.*, 1989).

#### 4. 3. 3 Effets rénaux

Des récepteurs à l'endothéline-1 ont été localisés dans plusieurs régions des reins (Koseki et *al.*, 1989 ; Davenport et *al.*, 1989 ; Orita et *al.*, 1989). L'endothéline-1 induit la vasoconstriction dans cet organe ce qui a pour conséquence d'augmenter la résistance vasculaire rénale, de réduire le flot sanguin et le taux de filtration glomérulaire (Firth et *al.*, 1988 ; Goetz et *al.*, 1988 ; Badr et *al.*, 1989 ; Cairnes et *al.*, 1989 ; Lopez-Farre et *al.*, 1989 ; Miller et *al.*, 1989). On observe également une diminution du flot urinaire et de l'élimination du sodium, ce qui indique que l'endothéline-1 favorise la réabsorption des fluides et du sodium (Miller et *al.*, 1989).



#### 4. 3. 4 Agent mitogénique et hypertrophique

L'endothéline-1 stimule la synthèse d'ADN des fibroblastes, des cellules mésangiales, des mélanocytes, des ostéoblastes, des CMLV et des cellules endothéliales (Masaki, 1993). L'activité mitogénique de l'endothéline-1 est accentuée par d'autres facteurs de croissance comme l'« insulin-like growth factor » (IGF), l'insuline, le « endothelial growth factor » (EGF), le PDGF et le TGF- $\beta$  (Takuwa et *al.*, 1989 ; Komuro et *al.*, 1988 ; Janakidevi et *al.*, 1992).

En plus de la synthèse d'ADN, l'endothéline stimule la synthèse de protéines et d'ARN dans les CMLV et les myocytes cardiaques (Chua et *al.*, 1992 ; Shubeita et *al.*, 1990). L'endothéline-1 pourrait jouer un rôle important dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et vasculaire ainsi que dans le développement de l'athérosclérose.

#### 4. 3. 5 Autres

L'endothéline-1 favorise la synthèse et la sécrétion de l'ANP des myocytes de l'oreillette (Hu et *al.*, 1988) ainsi que la synthèse et la sécrétion de l'aldostérone des surrénales (Miller et *al.*, 1989). Elle atténue la relâche de rénine de glomérules isolés et de cellules juxtaglomérulaires *in vitro* (Rakugi et *al.*, 1988 ; Takagi et *al.*, 1988 ; Matsumura et *al.*, 1989).

#### 4. 4 Rôle de l'endothéline-1 dans diverses conditions pathophysiologiques

Plusieurs rapports ont été publiés quant au rôle possible de l'endothéline-1 dans une variété de conditions pathophysiologiques (Stephenson et *al.*, 1994). Un accroissement de l'endothéline-1 circulante est associé avec une variété de pathophysiologies au niveau du cœur incluant des infarctus du myocarde et des insuffisances cardiaques (Miyauchi et *al.*, 1989 ; Caverio et *al.*, 1990 ; Schrader et *al.*, 1990 ; Lam et *al.*, 1991 ; Cody et *al.*, 1992). Une augmentation de l'endothéline-1 plasmatique est aussi associée avec des pathologies rénales comme l'inflammation glomérulaire et l'insuffisance rénale (Cairnes et *al.*, 1988 ; Firth et *al.*, 1990 ; Kon et *al.*, 1990 ; Schrader et *al.*, 1990 ; Tomita et *al.*, 1990 ; Awazu et *al.*, 1991 ; Simonson et Dunn, 1991 ; Deray et *al.*, 1992 ; Fogo et *al.*, 1992). Egalement, plusieurs pathophysiologies pulmonaires sont associées avec un accroissement de l'endothéline-1 plasmatique incluant l'asthme, des tumeurs pulmonaires et l'hypertension pulmonaire (Giaid et *al.*, 1990 ; Mattoli et *al.*, 1991 ; Stewart et *al.*, 1991b ; Cody et *al.*, 1992). On observe également une corrélation avec plusieurs pathophysiologies postopératoires comme dans la période suivant les transplantations de cœur, de rein et de foie (Schrader et *al.*, 1990 ; Lerman et *al.*, 1991, 1992). Un accroissement de l'endothéline-1 a aussi été observé dans plusieurs maladies comme, les colites ulcéreuses, l'urémie et l'arthrite (Luscher et *al.*, 1989 ; Saito et *al.*, 1989 ; Kohno et *al.*, 1990 ; Yamane et *al.*, 1991 ; Rachmilewitz et *al.*, 1992 ; ). Cette accroissement a aussi été observé dans l'hypertension essentielle (Krum et *al.*, 1998) et l'athérosclérose.

## **5. RÉGULATION DE L'ENDOTHÉLINE-1 ET DE SES RÉCEPTEURS PAR LES GLUCOCORTICOÏDES**

L'endothéline-1 est un puissant agent vasopresseur et l'administration intraveineuse de ce peptide cause une augmentation rapide de la pression artérielle. Jusqu'à maintenant peu d'études ont été réalisées quant au rôle possible de ce vasopresseur dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes.

Jusqu'à présent, il a été démontré que les glucocorticoïdes diminuent les récepteurs ET<sub>A</sub> au niveau des CMLV de rats en culture sans changer l'affinité pour ET-1 (Provencher et *al.*, 1995 ; Nambi et *al.*, 1992 ; Roubert et *al.*, 1993 ; Kato et *al.* 1995). Ce résultat était plutôt inattendu puisque les glucocorticoïdes, habituellement, modulent à la hausse les récepteurs d'agents vasoactifs, comme l'angiotensine II et la noradrénaline (voir chapitre antérieur). Il a également été démontré que les glucocorticoïdes diminuent les récepteurs ET<sub>A</sub> chez les cellules endothéliales cérébromicrovasculaires humaines en culture (Stanimirovic et *al.*, 1994).

Cependant, des études ont démontré que les glucocorticoïdes augmentent la sécrétion de l'endothéline-1 dans les CMLV (Kato et *al.*, 1995; Kanse et *al.*, 1991; Roubert et *al.*, 1990). Une sécrétion accrue a aussi été observée dans une lignée de cellules endothéliales humaines (HUVEC ; Huang et *al.*, 1995), mais pas dans des cellules endothéliales bovines (Kanse et *al.*, 1991). Des différences dans les protocoles expérimentaux pourraient expliquer ces divergences. Une augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'endothéline-1 a aussi été observée chez une lignée monocyttaire (U937 ; Aubert et *al.*, 1997) et chez les cellules T47D (lignée de cellules de cancer

mammaire humain) (Schrey et *al.*, 1992), respectivement, suite à un traitement avec des glucocorticoïdes. Par contre, les glucocorticoïdes n'ont pas d'effet ou même inhibent la transcription de la ppET-1 dans d'autres types cellulaires (Kanse et *al.*, 1991 ; Calderon et *al.*, 1994 ; Laporte et *al.*, 1995 ; Vittori et *al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que les glucocorticoïdes modulent l'expression et la sécrétion de l'endothéline-1 avec une spécificité cellulaire.

Des évidences démontrent que les glucocorticoïdes modulent aussi l'expression de la ppET-1 *in vivo*. L'administration de dexaméthasone fait augmenter rapidement l'expression de la ppET-1 et diminue l'expression des récepteurs ET<sub>B</sub> dans l'hypothalamus et le cervelet chez le rat (Shibata et *al.*, 1995).

## 6. HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Les glucocorticoïdes sont impliqués dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. En excès, ils provoquent une augmentation rapide de la pression artérielle. Les mécanismes amenant cette augmentation de la pression artérielle ne sont pas encore totalement élucidés. Peu d'attention a été portée sur le rôle possible de l'endothéline-1 dans l'hypertension induite par ce stéroïde.

Il a été démontré que les glucocorticoïdes augmentent la sécrétion de l'endothéline-1 dans les CMLV en culture (Kato et *al.*, 1995; Kanse et *al.*, 1991; Roubert et *al.*, 1990). Les mécanismes responsables de cette augmentation sont encore inconnus. Une augmentation de l'expression du gène de la ppET-1 est notre hypothèse.

Comme l'action autocrine de l'endothéline-1 dans les CMLV a déjà été démontrée (Hahn et *al.*, 1990 ; Alberts et *al.*, 1994), l'augmentation de la sécrétion de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes peut avoir des effets physiologiques sur les CMLV : augmentation de la contraction et des effets mitogéniques de l'endothéline-1. De plus, les glucocorticoïdes inhibent les effets vasorelaxants de l'endothéline-1 en inhibant la production d'oxyde nitrique et de prostacyclines. Ensemble, ces actions résultent en un effet potentialisateur de la vasoconstriction de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes et pourraient expliquer, en partie du moins, l'augmentation de la pression artérielle observée chez les rats suite à l'administration de dexaméthasone.

Par contre, le traitement des CMLV avec les glucocorticoïdes amène une diminution du nombre de récepteurs ET<sub>A</sub> (Provencher et *al.*, 1995 ; Nambi et *al.*, 1992 ; Roubert et *al.*, 1993 ; Kato et *al.*, 1995). Ce résultat semble en contradiction avec les effets potentialisateurs de la vasoconstriction par les glucocorticoïdes. Cependant, il a été démontré que le peptide ET-1 exerçait un rétrocontrôle négatif sur l'expression de ses récepteurs ET<sub>A</sub> dans les CMLV et dans d'autres types cellulaires (Hirata et *al.*, 1988). Ce mécanisme est courant et essentiel dans les diverses actions hormonales. Le rétrocontrôle négatif exercé par l'endothéline-1, induit par les glucocorticoïdes, pourrait être un mécanisme responsable de la diminution des récepteurs ET<sub>A</sub>.

Toutes les données obtenues jusqu'à maintenant sur la régulation de l'expression et de la sécrétion de l'endothéline-1 ainsi que de la régulation de ses récepteurs par les glucocorticoïdes au niveau vasculaire sont les résultats d'études réalisées avec des cultures cellulaires. Pour étudier le rôle de l'endothéline-1 dans l'induction de l'hypertension par les glucocorticoïdes, l'étude *in vivo* chez le rat s'avère donc essentielle. Cette étude nous permettra de vérifier si l'expression de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> est modulée dans l'aorte de rat et si la sécrétion d'endothéline-1 plasmatique est altérée.

Dans le but d'élucider le rôle de l'endothéline-1 dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes, les objectifs du présent projet de recherche sont de déterminer :

A) *In vitro* :

- 1) s'il y a augmentation de l'expression de la ppET-1 dans les CMLV. Si tel est le cas, les mécanismes modulant les niveaux d'expression (transcription *de novo* et/ou de la stabilité, synthèse protéique) seront aussi élucidés.
- 2) si les glucocorticoïdes diminuent l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> dans les CMLV et si cela est réalisé via l'augmentation de la production d'endothéline-1 (rétroaction négative). Ceci sera déterminé en utilisant un antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub>, le BQ 123.

B) *In vivo* :

- 1) si les glucocorticoïdes modulent l'expression des gènes de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'aorte de rat et s'ils augmentent les niveaux d'endothéline-1 plasmatique chez le rat.

Ces travaux amélioreront notre compréhension des mécanismes par lesquels les glucocorticoïdes régulent l'expression de l'endothéline-1 et son récepteur ET<sub>A</sub> à la fois chez des cellules en culture et chez un modèle animal. Etant donné l'effet vasopresseur important de l'endothéline-1 et son implication dans certaines conditions pathophysiologiques du système cardio-vasculaire, l'étude de sa régulation par les glucocorticoïdes s'avère très importante. La modulation de l'expression de ce peptide et de son récepteur par les glucocorticoïdes pourrait contribuer à l'hypertension induite par les glucocorticoïdes.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1. ÉTUDES *IN VITRO* CHEZ LES CMLV**

#### **1. 1 Isolation et culture des CMLV**

Les CMLV de l'aorte de rat en culture secondaire sont utilisées pour réaliser les expériences. Ces cellules sont utilisées par nous et plusieurs autres groupes dans l'étude des mécanismes impliqués dans l'hypertension. Les aortes thoraciques de 5 rats Wistar mâles de 200 g (Charles River Canada, St-Constant, Canada) sont rapidement prélevées et dégagées des tissus graisseux et conjonctifs dans un milieu « Hanks' balanced salt solution » (HBS) froid (Life Technologies, Burlington, ON, Canada, #14060-057) contenant 1X PSF (100U/ml de pénicilline G / 100µg/ml streptomycine / 0,25 µg/ml amphotéricine B comme fongicide) (Life Technologies, # 15240-062), le tout de la façon la plus stérile possible. Dégagées des tissus graisseux et conjonctifs, les aortes sont alors coupées longitudinalement et incubées à 37°C pendant 30 min avec 3 mg/ml de collagénase de type A (Life Technologies, #17100-017) afin d'enlever l'endothélium vasculaire. Les aortes sont mises dans du milieu HBSS frais et les couches musculaires media et intima sont enlevées de l'adventitia avec des pinces. La couche de muscle lisse est ensuite coupée en petits fragments de 1 à 2 mm qui sont incubés pour 45 min à 37°C avec 3 mg/ml de collagénase et 2,5 mg d'élastase (Boehringer Mannheim, Laval, QC,



Canada, #1027 891). Les cellules en suspension sont centrifugées 5 min à 100 g, le milieu décanté et les cellules resuspendues dans un milieu « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM) (Life Technologies, #12100-046) avec 15% de sérum bovin fœtal (SBF) (Life Technologies, #26140-079), 1X de PSF et 2mM de L-glutamine (Life Technologies, #25030-081). Ces cellules sont mises en culture dans des Pétris de 100 mm, à 37°C dans 7% CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé le lendemain pour enlever les cellules non adhérentes et remplacé par un milieu DMEM complet i.e. contenant 10% sérum, 1X PSF et 2mM de L-glutamine. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à confluence des cellules. Les cellules confluentes forment un patron de monts et vallées, une caractéristique des CMLV en culture. Les cellules sont utilisées entre les passages 2 et 8 pour chaque expérience.

## **1.2 Passage des cellules**

Lorsque les cellules atteignent la confluence, le milieu des cellules est enlevé, les cellules rincées avec un tampon phosphate salin (PBS) et 2,5 ml de trypsine-EDTA (0,25 % trypsine) (Life Technologies, #25200-056) est ajouté. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 5 min dans le but de les décoller du Pétri. Les cellules trypsinisées sont déposées dans un milieu DMEM complet dans le but d'inhiber l'action de la trypsine et sont centrifugées 10 min à 100 g. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu DMEM complet et les cellules sont dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre. Elles sont réensemencées à 1,5 million par Pétri de 100 mm.

### **1.3 Identification des cellules par immunocytochimie**

L'identité des CMLV isolées de l'aorte thoracique de rat est vérifiée par immunocytochimie utilisant un anticorps spécifique pour le microfilament  $\alpha$ -actine des muscles lisses (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada, #A2547). Les cellules sont mises en culture sur lame jusqu'à ce qu'elles soient à 50% de la confluence. Le milieu de culture est alors changé et les cellules sont lavées avec du HBS pour 5 min. Les cellules sont fixées au méthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour 10 min et ensuite réhydratées 10 min dans le HBS. Elles sont alors incubées avec 50  $\mu\text{l}$  de l'anticorps primaire dirigé contre les microfilaments  $\alpha$ -actine des muscles lisses (1/400) pour 30 min. Trois lavages de 10 min sont ensuite réalisés avec le HBS. Les cellules sont incubées avec 50  $\mu\text{l}$  de l'anticorps IgG-souris couplé à un fluorochrome (FITC) (24  $\mu\text{g/ml}$ ) pour 30 min à la noirceur et ensuite trois lavages de 10 min sont effectués avec le HBSS. Les lames sont montées avec 20  $\mu\text{l}$  de Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) et scellées avec un vernis à ongles. Les cellules sont observées sous un microscope à fluorescence.

## **1. 4 Traitement des cellules avec les stéroïdes**

Pour chaque expérience, les cellules sous-confluentes sont mises en absence de sérum pour 48 heures pour les rendre quiescentes et le traitement débute. Les cellules quiescentes sont incubées en présence de RU 28362, l'agoniste spécifique du récepteur des glucocorticoïdes (obtenu gracieusement de Roussel-Uclaf, Romainville, France), pour 0 à 24 heures, à une concentration de 100 nM sauf pour l'expérience dose-réponse où il est utilisé à des concentrations variant de 0,1 à 100 nM. Dans certaines expériences, l'antagoniste spécifique du récepteur des glucocorticoïdes (RU 38486 ; 1 µM) (obtenu gracieusement de Roussel-Uclaf, Romainville, France), la cycloheximide (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada, #C-7698), l'actinomycine D (10µg/ml) (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada, #A5156) ainsi que l'antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub> (BQ 123 ; 5 µM) étaient utilisés.

## **1. 5 Dosage de l'endothéline-1 du milieu de culture cellulaire**

Les cellules sont traitées ou non avec le RU 28362 et l'endothéline-1 immunoréactive (ir) du milieu de culture cellulaire est dosé par radioimmunoétalonnage (RIA) avec une trousse de dosage commerciale (Amersham, Oakville, ON, Canada, #RPA555) utilisant un anticorps anti-ET-3. 100 µl de milieu de culture est dosé selon les directives du manufacturier.

## **1. 6 Essai de transcription nucléaire (nuclear run-on assay)**

Le but de cette technique est de mesurer le taux de transcription de gènes spécifiques. La procédure est divisée en quatre étapes : (1) les noyaux cellulaires sont isolés ; (2) les noyaux sont incubés en présence de nucléotides dont un est radiomarké - ( $^{32}\text{P}$ -UTP) pour réaliser la transcription *in vitro* des ARNs dont la transcription est déjà amorcée. Les  $^{32}\text{P}$ -ARN sont ensuite purifiés ; (3) les nouveaux transcrits d'ARN spécifiques sont détectés par l'hybridation des  $^{32}\text{P}$ -ARN avec les cDNAs correspondants sur membrane de nitrocellulose.

### **1. 6. 1 Préparation des noyaux**

Les cellules (environ 15 millions) sont resuspendues dans 5 ml de tampon PBS très froid, centrifugées 5 min à 500g à 4°C et le surnageant est retiré complètement. Les cellules sont resuspendues dans 4 ml de tampon de lyse (10 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM chlorure de sodium (NaCl), 3 mM chlorure de magnésium ( $\text{MgCl}_2$ ) et 0.5 % Nonidet-P-40), vortexées pendant 10 sec. et mises sur glace pour 5 min. Ensuite, elles sont centrifugées 5 min à 500g (4°C), le surnageant est enlevé et les cellules sont lysées à nouveau avec 4 ml de tampon de lyse. Après centrifugation, les noyaux sont resuspendus dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon de congélation (50 mM Tris-Cl (pH 8.3), 40% glycérol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM éthylènediamine tétraacétate de sodium (EDTA), 0.5 mM de dithiothreitol (DTT) et 20U de RNAGuard (Pharmacia Biotech Inc., Baie D'Urfe, QC, Canada) et gelés dans l'azote liquide pour usage ultérieur.

### 1. 6. 2 Elongation et purification des ARNs nouvellement transcrits

Les noyaux décongelés sur glace sont centrifugés et le surnageant enlevé. Les ARNs nouvellement transcrits sont allongés *in vitro* pour 30 min à 28°C dans 100 µl d'une solution contenant 100 mM Tris-Cl (pH 7.9), 200 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 300 mM sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 4 mM chlorure de manganèse (MnCl<sub>2</sub>), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1.2 µM DTT, 1 mM de chacun ATP, CTP, GTP, 100 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (800 Ci/mmol) (Amersham, #PB 203), 10 U RNAGuard (Pharmacia Biotech Inc.), 35% glycérol et les noyaux. La solution est mélangée avec une pipette de 200 µl à pointe brisée. Suite à l'incubation, les noyaux sont brisés et l'ADN digéré en ajoutant 5 µl de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) (10 mM) et 2U d'ADNase dans une incubation de 10 min à 28°C. Une seconde et une troisième incubations sont réalisées en ajoutant à chaque fois 2U d'ADNase. Par la suite, un volume égal d'un tampon protéinase 2X (20mM Tris-Cl (pH 7.9), 20 mM EDTA, 1% SDS) et 50 µg de protéinase K (Promega Corporation, Madison, WI, USA, #PRV3021) sont ajoutés et le tout incubé à 42°C pendant 30 min. Les ARNs sont extraits au phénol : chloroforme et le surnageant chargé sur une colonne sephadex G50. Un volume égal d'une solution de 10% TCA et 60 mM de sodium pyrophosphate est ajouté et le tout est mis sur la glace pendant 30 min. Les ARNs sont centrifugés 15 min, le surnageant enlevé et les ARNs resuspendus dans 250 µl d'une solution de 20 mM Hepes pH 7,5 et 5 mM EDTA. Par la suite, 62,5 µl de NaOH (1M) est ajouté et laissé sur la glace pendant 15 min et 125 µl de Hepes (1M) pH 5.5 est ajouté. Les ARNs sont alors précipités à l'éthanol, lavés à l'éthanol 75% et

resuspendus dans 0,25 ml de tampon d'hybridation préalablement chauffé pendant 7 min à 80°C. Ce tampon est composé de : 50 mM Hepes, 0,75 NaCl, 40% formamide, 0,5 % SDS, 2mM EDTA, 10x Denhardt, 500 µg/ml d'ADN de sperme de saumon, 10 µg/ml de poly r A. La radioactivité incorporée est mesurée. La même quantité de radioactivité est ajoutée à chaque membrane pour l'hybridation.

#### 1. 6. 3. 1 Préparation des membranes de nitrocellulose

Les plasmides contenant les ADNcs de ppET-1 (rat ppET-1/pSP73) et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (pTRI-GAPDH-rat) sont linéarisés. Cinq µg d'ADN pour chaque puit est utilisé (cette quantité est en excès pour l'hybridation). Chaque 5 µg d'ADN est dénaturé avec 15 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (10N) dans un volume total de 250 µl pendant 30 min à température de la pièce. Pendant ce temps, la membrane de nitrocellulose est équilibrée 20 min dans l'eau puis 15 min dans de l'acétate d'ammonium (NH<sub>4</sub>OAc) (2M). Après la dénaturation, l'ADN est mis sur la glace et 250 µl de NH<sub>4</sub>OAc (2M) est ajouté. La membrane équilibrée est disposée sur 3 papiers filtres (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada, #162016) mouillés et le tout placé dans l'appareil Bio-Dot SF (Bio-Rad). Cinq cents µl d'échantillon est distribué dans chaque puit et fixé sur la membrane par succion. La membrane est alors rincée rapidement dans du NH<sub>4</sub>OAc (2M), et les échantillons coupés et séchés 30 min à température de la pièce puis 90 min dans un four sous vide à 80°C.

### 1. 6. 3. 2 Préhybridation, hybridation et lavages

Les membranes sont trempées dans une solution de chlorure de sodium et citrate de sodium (SSC) 2X et sont préhybridées pendant 24 heures à 42°C dans le tampon d'hybridation (décrit précédemment) préalablement chauffé pendant 10 min à 90°C. Les ARNs resuspendus dans le tampon d'hybridation sont hybridés pendant 48 heures à 42°C. Les lavages sont réalisés à 65°C pendant 3 heures dans un tampon 0.5X SSC et 0.1% SDS. Les membranes sont séchées à l'air et exposées 36 heures à -80°C sur film Biomax-MS de Kodak. L'intensité relative des bandes est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

## 1. 7 Mesure des niveaux d'ARNm par essai de protection des ARNm aux ARNases

Cette technique permet de mesurer l'abondance des messagers d'ARN spécifiques. La procédure se divise en 4 étapes principales : (1) les ARNs totaux sont extraits des cellules ; (2) une ou plusieurs sondes d'ARN antisenses radiomarquées ( $^{32}\text{P}$ ) sont préparées; (3) l'hybridation des ARNs totaux avec les sondes est réalisée dans une solution à haute stringence ; (4) les  $^{32}\text{P}$ -sondes non-hybridées (non-protégées) sont digérées par des nucléases d'ARN. Les fragments protégés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Cette technique offre plusieurs avantages par rapport à la technique de buvardage Northern : Une meilleure sensibilité est possible grâce à l'hybridation en solution qui permet une plus grande accessibilité des ARNs pour l'hybridation. De ce fait, la technique permet d'utiliser l'ARN cellulaire totale puisque seulement une faible quantité d'ARNm est nécessaire pour être détectée. La technique est relativement courte et nécessite peu de manipulation diminuant ainsi le risque de dégradation des ARNs. Cette technique assure également une grande spécificité d'hybridation puisqu'une parfaite homologie entre la sonde et les ARNs est nécessaire. Si notre but est de quantifier des messagers très peu exprimés dans les cellules, le PCR quantitatif s'avère cependant être une technique plus appropriée.

#### 1. 7. 1 Extraction des ARNs cellulaires

L'ARN est extrait des cellules avec le réactif Tripure (Boehringer Mannheim) selon les directives du fabricant. Trois ml de Tripure/10 millions de cellules est utilisé. L'ARN extrait est resuspendu dans du formamide déionisé et est ensuite dosé par spectrophotométrie.



### 1. 7. 2 Préparation des sondes

Le fragment de 214 pb (EcoRI-PvuII) excisé du plasmide ET-1/pGEM-7zf (+)(obtenu gracieusement du Dr Richard Larivière (Larivière et *al.*, 1993)) a été cloné dans les sites EcoR I-Pvu II du vecteur pSP73 (Promega) (rat ppET-1/ pSP73). Ce vecteur est linéarisé avec EcoR I et utilisé pour la préparation de la sonde ET-1 antisens. Également, un fragment de 425 pb de l'ADNc de ET<sub>A</sub> cloné dans le vecteur pBluescript SK<sup>-</sup> (rat ET<sub>A</sub>/ pBluescript SK<sup>-</sup>) (obtenu gracieusement de Tomoh Masaki ) linéarisé avec *EcoR I* et utilisé pour préparer la sonde ET<sub>A</sub> antisens. Finalement, un fragment de 137 pb du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase cloné dans le vecteur TRIPLEscript (pTRI-GAPDH-Rat) (Ambion Inc., Austin, TX, USA), linéarisé avec *BstO I* est utilisé comme contrôle interne. Les sondes antisens sont préparées avec la trousse de transcription Promega, selon les directives du manufacturier. D'abord, les composants suivants sont mélangés dans l'ordre pour permettre la transcription des sondes : 1X tampon de transcription, 10mM DTT, 15 U RNAGuard (Pharmacia Biotech Inc.), 0,5 mM de chacun (ATP, GTP, UTP), 12 µM CTP\*, 1 µg de plasmide linéaire, 25µCi α-<sup>32</sup>P CTP\*\* (Amersham, #PB.20382) et 10 U de T7 ARN polymérase dans un volume de 10 µl (\*13.9 µM pour GAPDH et 9 µM pour ET<sub>A</sub> ; \*\*10µCi pour GAPDH et 50 µCi pour ET<sub>A</sub>). La transcription est réalisée à 37°C pendant 1 heure. Par la suite, les sondes sont incubées 20 min à 30°C en présence de 3U d'ADNase. Elles sont ensuite extraites au phénol : chloroforme, précipitées dans l'éthanol 100% avec 0,5 M d'acétate d'ammonium et 30 U d'ARNt pour aider à la précipitation. Les sondes sont par la suite lavées à l'éthanol 75% puis resuspendues dans 50 µl de formamide.

### 1. 7. 3 Hybridation

L'hybridation est réalisée en présence de 50 µg d'ARN, 50 000 cpm de chaque sonde dans une solution 1X PIPES (acide 1, 4-pipérazinediéthanesulfonique) avec 80% formamide. Avant d'être mélangées avec l'ARN, les sondes sont chauffées à 65°C pendant 10 min. Une fois tous les composants mélangés, la solution est chauffée à 85°C pour 5 min puis rapidement placée à 50°C pour l'hybridation pendant 16 heures.

### 1. 7. 4 Digestion par les ARNases et électrophorèse

Les ARNs non-hybridés sont digérés dans une solution d'ARNases T1/A (Ambion Inc., #2286) pour 60 min avec 350 µl d'un tampon de digestion (5mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, 0,3 M NaCl pH 7,5). Pour arrêter l'action des ARNases, les ARNs sont ensuite traités avec 50 µg de protéinase K (Promega Corporation) dans 1% SDS. Les ARNs sont extraits au phénol/chloroforme, précipités dans l'éthanol 100% et resuspendus dans 15 µl d'un tampon d'électrophorèse. Les ARNs sont séparés sur gel de polyacrylamide 5% (29 : 1 acrylamide/bisacrylamide) /urée 7M. Après l'électrophorèse, le gel est exposé pendant 16 heures sur film XAR de Kodak. L'intensité relative des bandes est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). Les résultats sont exprimés en ratio ppET-1/GAPDH ou ET<sub>A</sub>/GAPDH (unités arbitraires).

## **2. ÉTUDES *IN VIVO* CHEZ LE RAT**

### **2.1 Traitement des rats**

Les rats Wistar mâles pesant environ 200g, nourris avec une diète normale, sont traités avec le dexaméthasone-acétate, un glucocorticoïde synthétique (Sigma-Aldrich Canada, #D-1881). Pour vérifier l'effet du dexaméthasone-acétate sur la pression artérielle des rats ainsi que sur la sécrétion d'endothéline-1 plasmatique, le dexaméthasone-acétate (2,5 mg/l) est introduit dans l'eau à boire des rats pour une période variant de 0 à 6 jours. Pour vérifier la régulation de l'expression des gènes de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'aorte, ce glucocorticoïde est injecté à une dose variant de 0 à 2,5 mg/kg intrapéritonéale pour une période variant de 0 à 24 heures.

### **2.2 Mesure de la pression artérielle**

Les rats Wistar mâles reçoivent une diète normale et de l'eau *ad libitum*. Pour les mesures de pression artérielle sur une longue période (6 jours), les rats sont divisés en deux groupes de 8 animaux : un groupe de rats contrôles recevant de l'eau du robinet et un groupe de rats traités recevant une solution de dexaméthasone-acétate (2,5 mg/l) comme eau à boire pendant 6 jours. La pression artérielle des rats est mesurée de façon indirecte par la méthode « tail-cuff » (Byrom et Wilson, 1938) à partir du jour 3 avant le début de l'expérience pour acclimater les rats, jusqu'au jour 6. Pour les mesures de pression

artérielle sur une courte période (8 heures), les rats reçoivent une injection i.p. variant de 0 à 2,5 mg/kg de dexaméthasone-acétate et la pression est mesurée au temps 0 et 8 heures. La pression artérielle est mesurée en moyenne trois fois par rat chaque jour et une moyenne de deux mesures est utilisée pour la compilation des résultats. Seules les mesures de pression systolique sont illustrées dans les résultats.

### **2.3 Dosage de l'endothéline-1 plasmatique**

Les rats Wistar reçoivent une diète normale et de l'eau *ad libitum*. Les rats sont divisés en deux groupes de 8 animaux : un groupe de rats contrôles recevant de l'eau du robinet et un groupe de rats traités recevant une solution de dexaméthasone-acétate (2,5 mg/l) comme eau à boire pendant 5 jours. Au deuxième jours de traitement, la moitié des rats traités et la moitié des rats contrôles sont sacrifiés et exsanguinés. Le reste des rats sont sacrifiés au jours 5 de traitement. Le sang est recueilli et ET-1 ir plasmatique est dosé par RIA à l'aide d'une trousse commerciale (Amersham). Le dosage d'ET-1 plasmatique est réalisé essentiellement comme celui du milieu de culture, selon les directives du manufacturier à la différence qu'il est précédé d'un extraction acide et d'une purification sur colonne. Deux cents µl de plasma est acidifié avec une quantité égale de H<sub>2</sub>O/TFA (acide trifluoroacétique) 1% et centrifugé 1 min à 13000 rpm. Pendant ce temps, les colonnes Sep-pak C-18 (Amersham, #RPN 1900) sont conditionnées d'abord avec 1 ml de méthanol puis 1 ml de H<sub>2</sub>O/TFA 0,1%, à l'aide d'un vacuum. Le surnageant des plasmas acidifiés est passé sur les colonnes puis celles-ci sont lavées avec 3 x 1 ml de H<sub>2</sub>O/TFA 0,1% . Les échantillons sont élués 2 fois avec 1ml de méthanol, évaporés, puis

resuspendus dans le tampon inclus dans la trousse commerciale. Le dosage par RIA est ensuite réalisé utilisant 100 µl de plasma reconstitué.

## **2. 4 Mesure des niveaux d'ARNm par essai de protection des ARNm aux ARNases**

### **2. 4. 1 Extraction des ARNs des aortes**

Les rats sont sacrifiés, les aortes rapidement prélevées et congelées dans l'azote liquide puis conservées à -70°C jusqu'à usage ultérieur. Pour l'extraction de l'ARN, les aortes sont brisées à l'aide d'un Polytron en utilisant 1,5 ml de Tripure / 100 mg d'aorte. Le reste de l'extraction, la préparation des sondes, l'hybridation et la digestion des fragments protégés par les ARNases sont réalisés de la même façon que pour les cellules en culture.

# RÉSULTATS

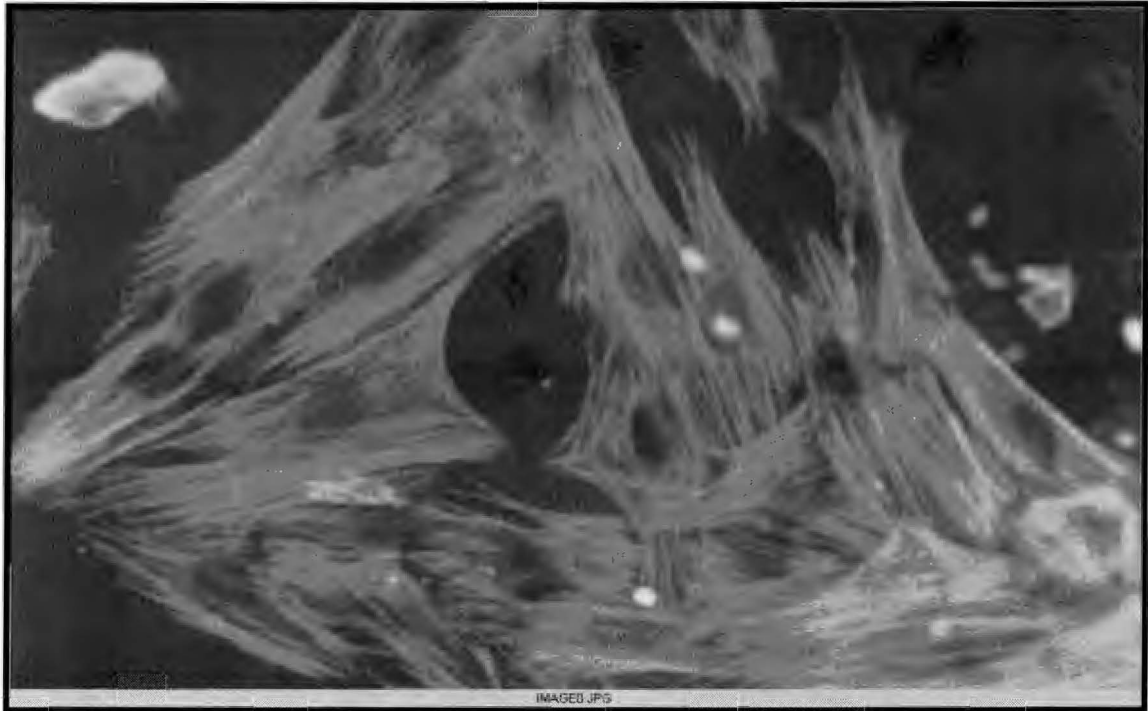
## **1. ÉTUDES *IN VITRO* CHEZ LES CMLV**

### **1. 1 Identité des CMLV vérifiée par immunocytochimie**

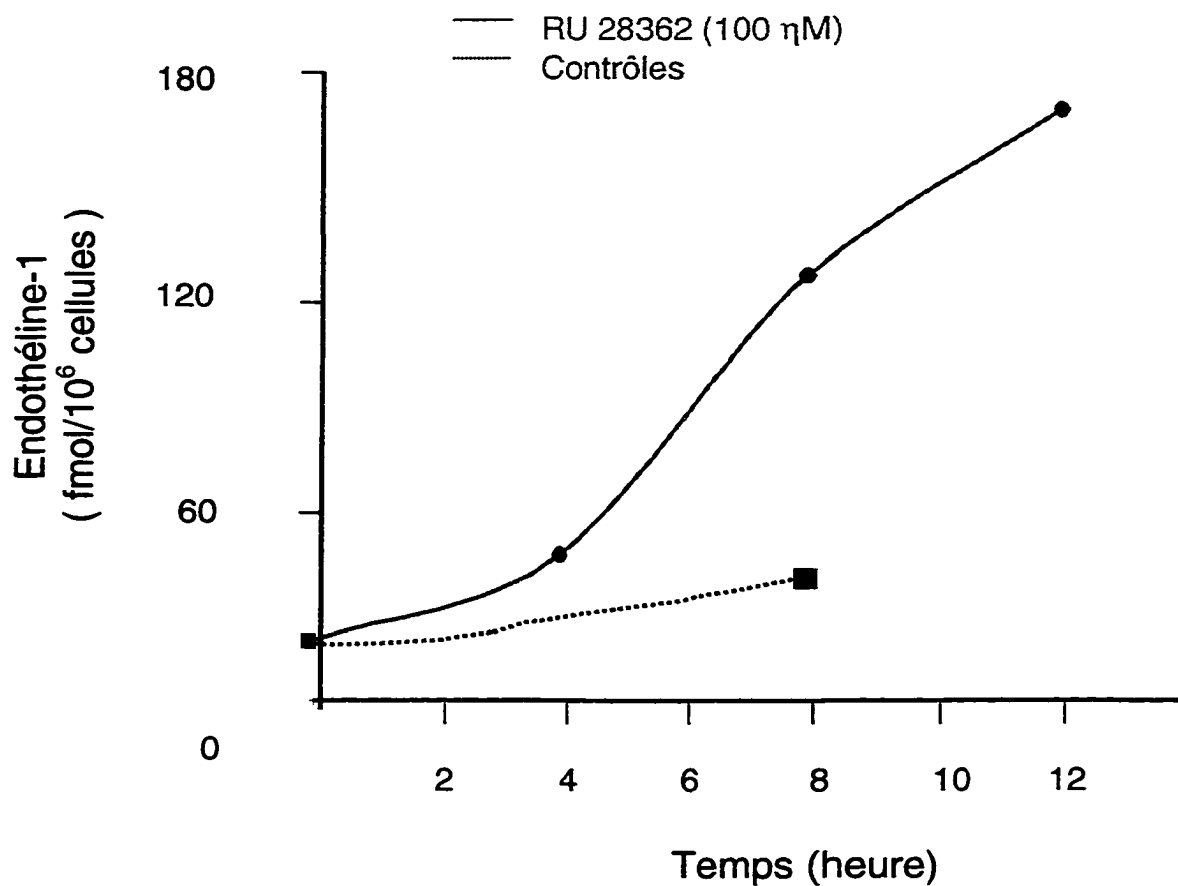
L'identité des CMLV isolées de l'aorte thoracique de rat est vérifiée par immunocytochimie en utilisant un anticorps spécifique au filament d' $\alpha$ -actine des cellules du muscle lisse (Figure 5). Cette identification révèle que plus de 95% des cellules isolées sont des CMLV.

### **1. 2 Les glucocorticoïdes stimulent la sécrétion d'endothéline-1 chez les CMLV**

Pour vérifier que la sécrétion d'endothéline-1 dans les CMLV est bien augmentée lors d'un traitement aux glucocorticoïdes comme plusieurs groupes l'ont démontré (Kato et *al.*, 1995; Kanse et *al.*, 1991; Roubert et *al.*, 1990), les CMLV ont été traitées avec 100nM de RU 28362, l'agoniste spécifique des récepteurs de type II des glucocorticoïdes, pendant 12 heures. L'endothéline-1 immunoréactive a été dosée du milieu de culture des CMLV par RIA en utilisant une trousse commerciale. La figure 6 montre une augmentation rapide de la sécrétion d'endothéline-1 dans le milieu de culture cellulaire dès les premières heures de traitement. On observe un niveau de base équivalent à 18 fmol ET-1 ir / million de cellules qui passe à 180 fmol ET-1 ir / million de cellules après 12 heures de traitement au RU 28362. Le niveau de sécrétion basale de ET-1 dans les CMLV après 8h n'a pu être vérifié étant donné la perte de l'échantillon. Selon la littérature, la sécrétion basale augmente graduellement.



**Figure 5. Identification des CMLV par immunocytochimie.** L'identité des CMLV isolées de l'aorte thoracique de rat est vérifiée par immunocytochimie en utilisant un anticorps spécifique au filament d' $\alpha$ -actine des CMLV.



**Figure 6. Effet du RU 28362 sur la sécrétion d'endothéline-1 ir dans le milieu de culture des CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées en présence (—) ou absence (---) de 100  $\mu$ M de RU 28362 pendant 0 à 12 heures. L'endothéline-1 ir sécrétée dans le milieu de culture est dosée par RIA à l'aide d'une trousse commerciale.



### **1. 3 Effet des glucocorticoïdes sur l'expression du gène de la ppET-1 dans les CMLV**

#### **1. 3. 1 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 de façon rapide et transitoire**

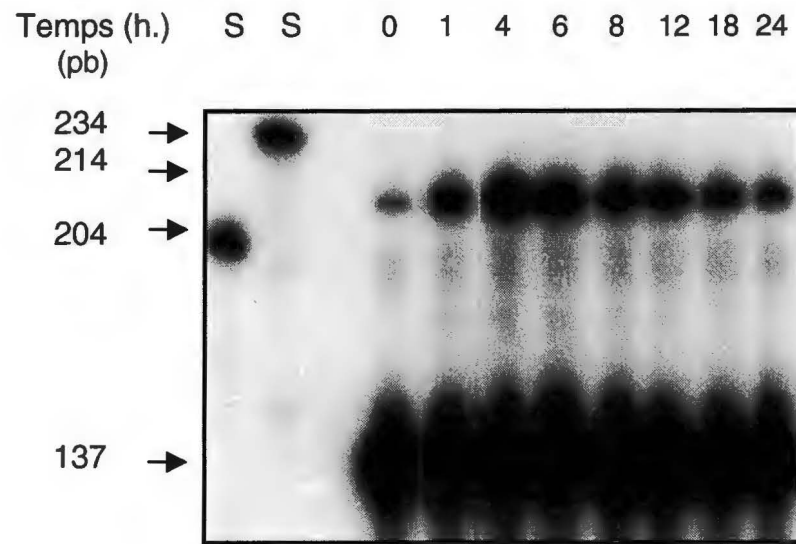
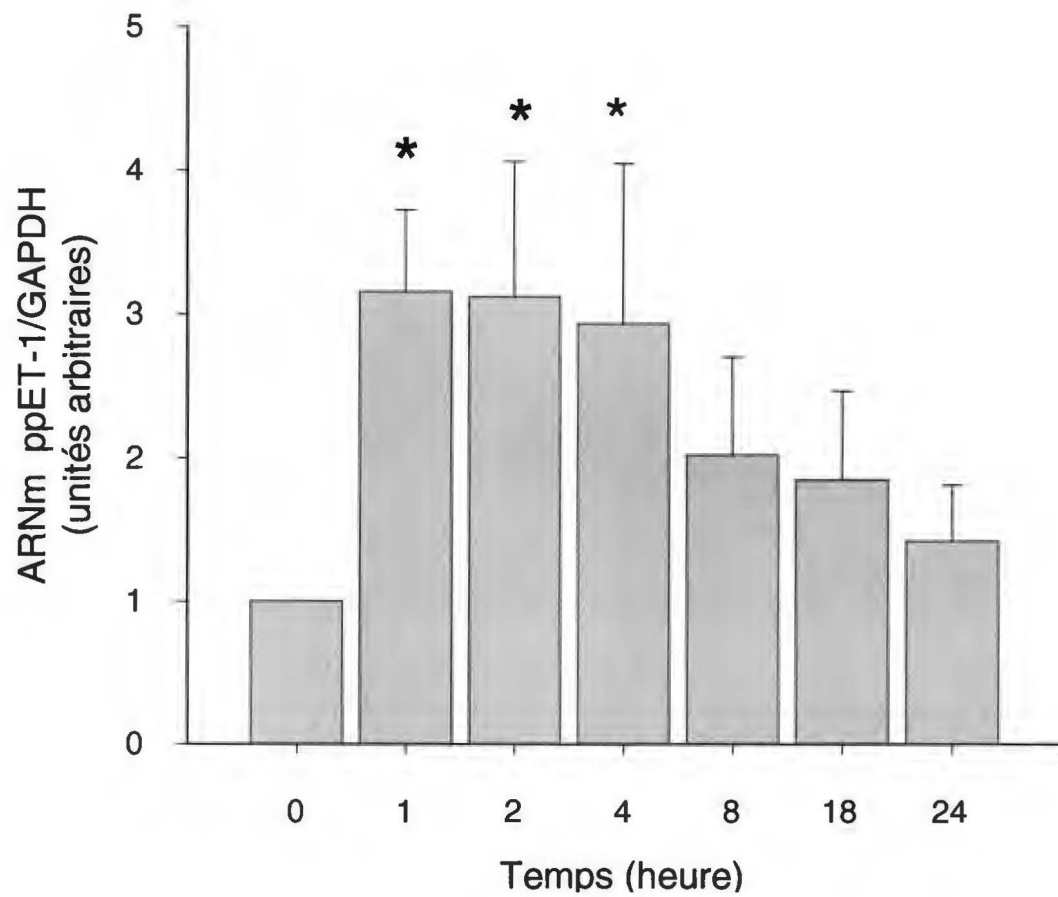
Le traitement des CMLV avec le RU 28362, à une dose de 100 nM, provoque une augmentation rapide et transitoire de l'expression de l'ARNm de ppET-1 (Figure 7). Une stimulation maximale de 3,3 fois est observée après 1 heure de traitement, et les niveaux d'ARNm de ppET-1 demeurent élevés pendant 4 heures pour ensuite décroître graduellement vers le niveau contrôle comme nous avons pu le déterminer par essai de protection des ARNm aux ARNases (Figure 7A).

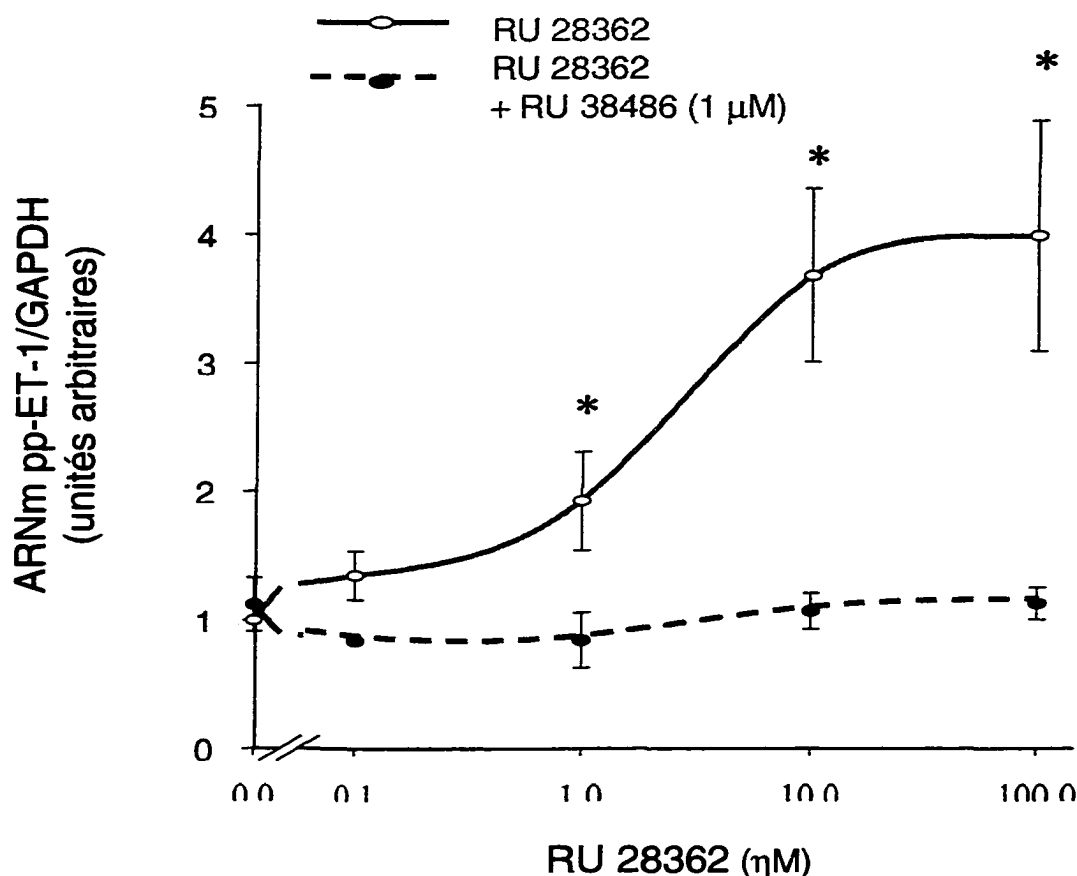
#### **1. 3. 2 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 via le récepteur (type II) des glucocorticoïdes**

L'effet du RU 28362 sur les niveaux d'expression de l'ARNm de la pp-ET-1 est dose-dépendant comme montré à la figure 8. L'effet maximal est observée à 100 nM de RU 28362 et la moitié de l'effet maximal, à 2-3 nM. De plus, l'action stimulatrice du RU 28362 est complètement renversée par la co-incubation avec l'antagoniste des récepteurs de type II des glucocorticoïdes, le RU 38486 (1 µM), démontrant clairement que les glucocorticoïdes modulent les niveaux d'ARNm de la ppET-1 en se liant aux récepteurs de type II des glucocorticoïdes.

**Figure 7. Cinétique de temps de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées en présence de 100  $\eta$ M de RU 28362 pendant 0 à 24 heures. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNs aux ARNases est effectué. Dans la figure A, les bandes à 234 et 214 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de la ppET-1 respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 16 heures sur film XAR de Kodak. L'intensité relative des bandes ppET-1 et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ppET-1/GAPDH. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard de quatre expériences.

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

**A****B**



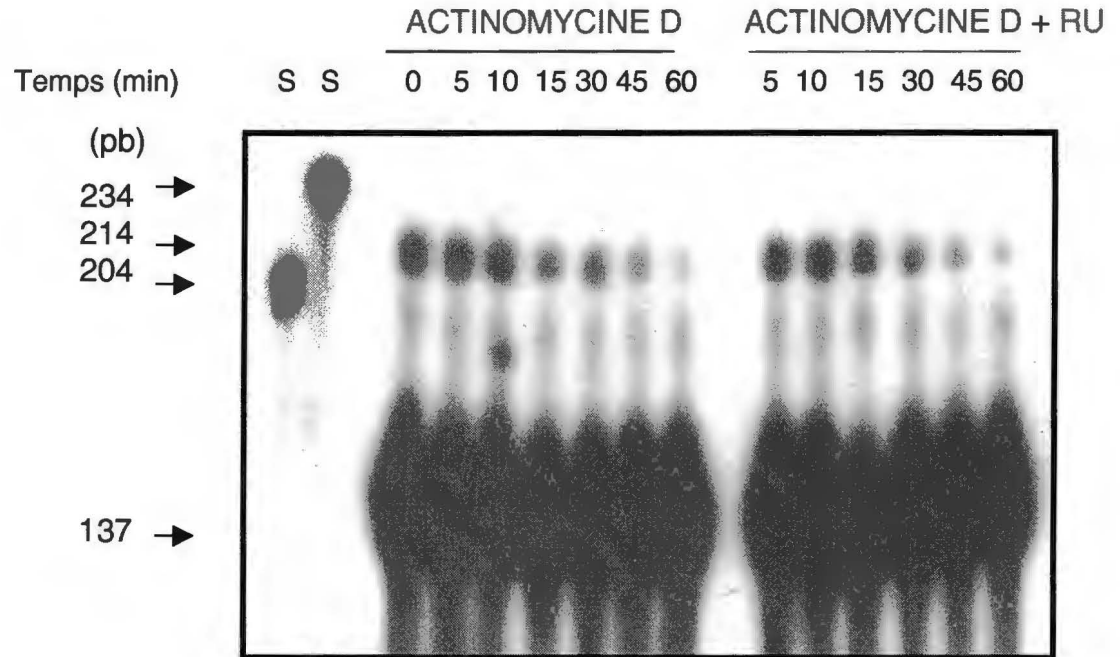
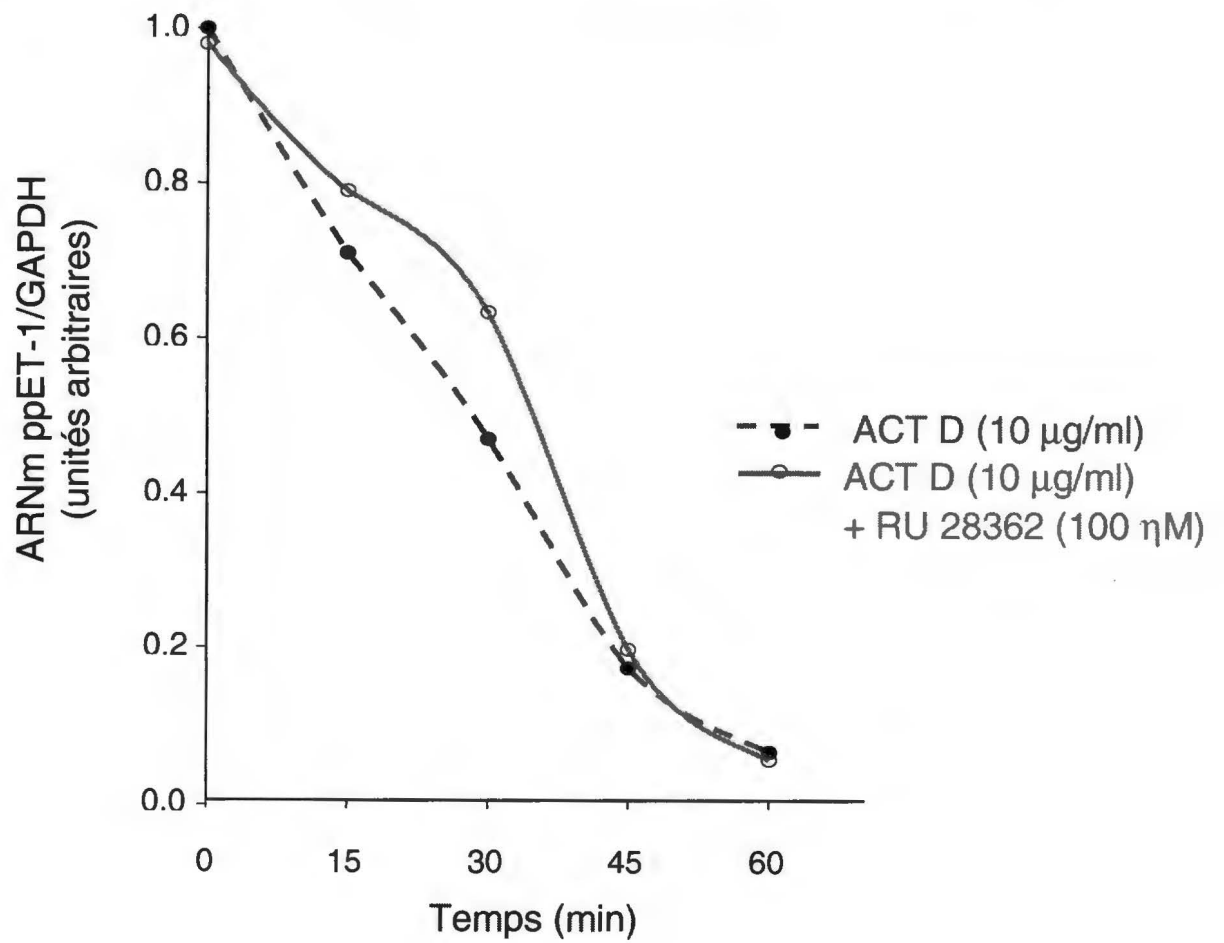
**Figures 8. Courbe dose-réponse de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées en présence de concentrations croissantes de RU 28362, avec (----) ou sans (—) RU 38486 (1  $\mu$ M), pour 1 heure. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNs messagers aux ARNases est effectué. Après électrophorèse, l'intensité relative des bandes pp-ET-1 et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure représente le ratio de l'expression des ARNm ppET-1/GAPDH. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard de quatre expériences.

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

### **1. 3. 3 Les glucocorticoïdes ne modifient pas la stabilité des messagers de la ppET-1**

Pour déterminer si les glucocorticoïdes augmentent les niveaux d'ARNm *via* un mécanisme transcriptionnel ou post-transcriptionnel, les CMLV furent incubées avec un inhibiteur de transcription, l'actinomycine D (10 µg/ml), en présence ou en absence du RU 28362 (100 nM) pendant 0 à 60 min. L'étude avec l'actinomycine D révèle que la demi-vie de l'ARNm de ppET-1 est d'environ 18-20 min dans les cellules contrôles et les cellules traitées au RU 28362 (Figure 9). Ce résultat démontre bien que l'augmentation des niveaux d'expression de l'ARNm par les glucocorticoïdes que l'on observe ne peut être expliquée par une augmentation de la stabilité des messagers d'ARN.

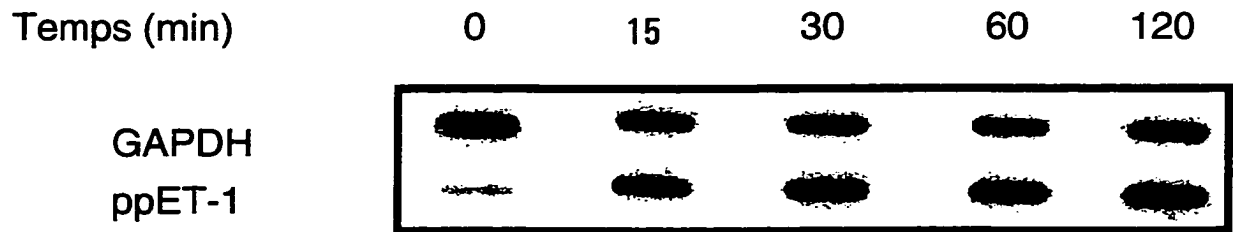
**Figure 9. Effet de l'actinomycine D et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées avec l'actinomycine D (10µg/ml) seul ( ---- ) ou en présence de 100 nM RU 28362 ( — ) pendant 0 à 60 min. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNs aux ARNases est effectué. Dans la figure A, les bandes à 234 et 214 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de la ppET-1 respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 16 heures sur film XAR de Kodak. L'intensité relative des bandes ppET-1 et GAPDH est mesurée par un phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ppET-1/GAPDH. Les résultats sont la moyenne de trois expériences.

**A****B**

### **1. 3. 4 Les glucocorticoïdes augmentent la transcription *de novo* de la ppET-1**

Pour confirmer que l'induction des niveaux stables d'ARNm de la ppET-1 par les glucocorticoïdes est un mécanisme transcriptionnel, un essai de transcription nucléaire (nuclear run-on assay) a été réalisé. Le traitement des CMLV avec 100 nM de RU 28362 pour 15 min augmente clairement la transcription de la ppET-1 de 3,5 fois (Figure 10). L'effet maximal est observé à 60 min avec une induction de 4,5 fois par rapport au contrôle, et le taux de transcription demeure élevé pour plus de 120 min.

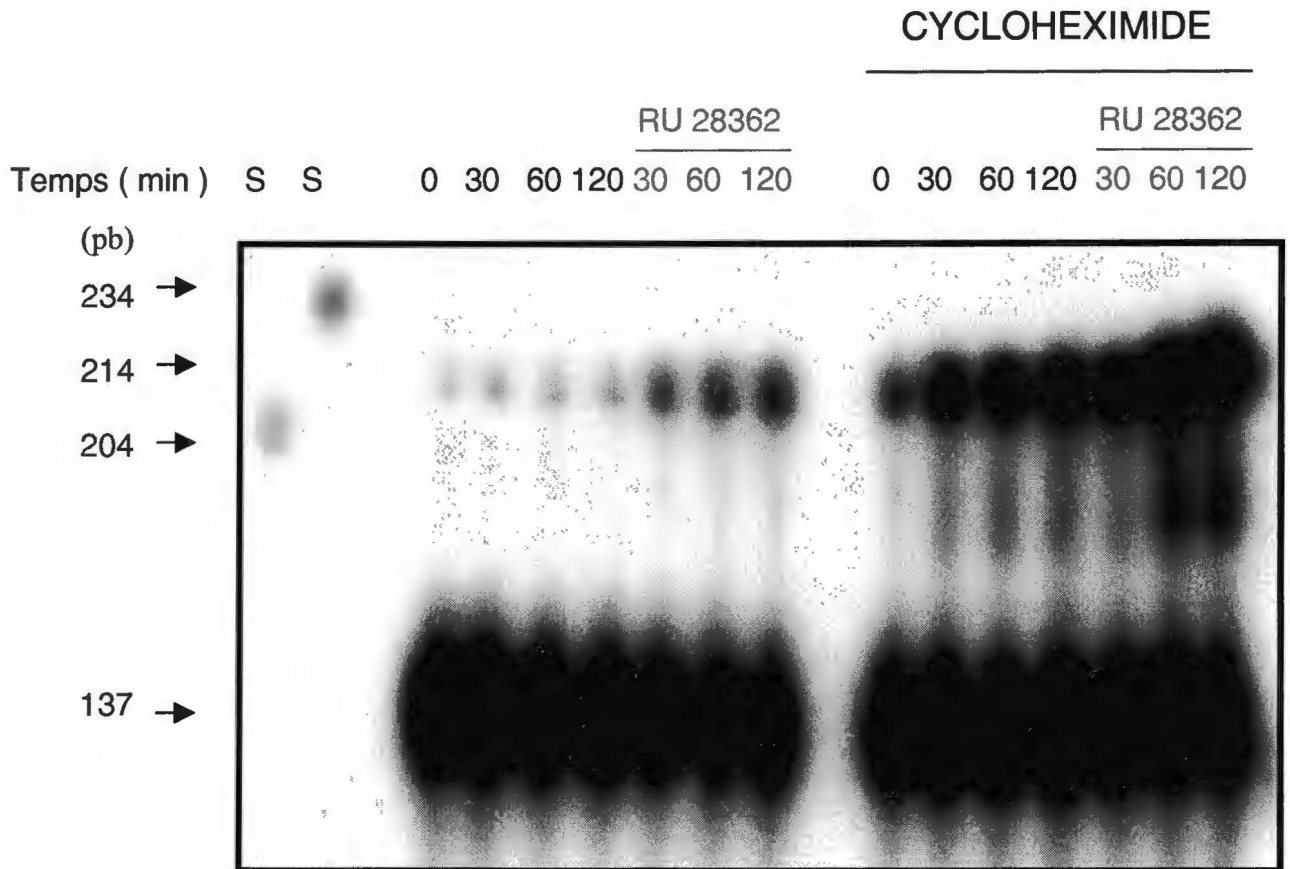




**Figure 10. Effet du RU 28362 sur la transcription *de novo* de la ppET-1.** Les CMLV quiescentes sont incubées en présence de 100 nM de RU 28362 pour 0 à 120 min. Les noyaux ( $\approx 15$  millions ) sont récupérés et l'essai de transcription nucléaire effectué. Les ARNs nouvellement transcrits sont hybridés avec les ADNc de la ppET-1 et GAPDH préalablement linéarisés et fixés sur membranes de nitrocellulose. Les membranes sont exposées pendant 36 heures sur film Biomax-MS de Kodak. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative de trois.

### **1. 3. 5 L'induction d'expression du gène de la ppET-1 par les glucocorticoïdes ne nécessite pas la synthèse protéique**

Des études avec un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide ( 5 µg/ml) en présence ou absence du RU 28362 (100 nM) nous révèlent que l'augmentation des niveaux d'ARNm de la ppET-1 par les glucocorticoïdes ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines. En effet, le traitement des CMLV avec la cycloheximide en concomitance avec le RU 28362 ne prévient pas l'induction des niveaux d'ARNm induite par les glucocorticoïdes (Figure 11). À noter que les niveaux des messagers de la ppET-1 en présence de la cycloheximide seule sont plus élevés que les niveaux de base. Cette super-induction (effet secondaire) serait attribuable à l'augmentation de la stabilité des messagers de la ppET-1 (riche en séquences « AUUUA » et  $Au_n$ ) par la cycloheximide (Inoue et al., 1989 ; Chen et Shyu, 1995). Le traitement avec les glucocorticoïdes seuls amène une induction d'expression de l'ARNm de la ppET-1 de 3,7 fois par rapport aux contrôles. La cycloheximide seule, augmente de 9,9 fois les niveaux d'ARNm de ppET-1 et lorsque celle-ci est ajoutée en présence de RU 28362, cette induction s'élève à 15 fois par rapport aux CMLV contrôles.



**Figure 11. Effet de la cycloheximide et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées avec la cycloheximide (5μg/ml) seule ou en présence de 100 nM RU 28362 pendant 0 à 120 min. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNs aux ARNases est effectué en utilisant 50μg d'ARN. Les bandes à 234 et 214 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de la ppET-1, respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH, respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 16 heures sur film XAR de Kodak. Les résultats sont ceux d'une expérience représentative de trois.

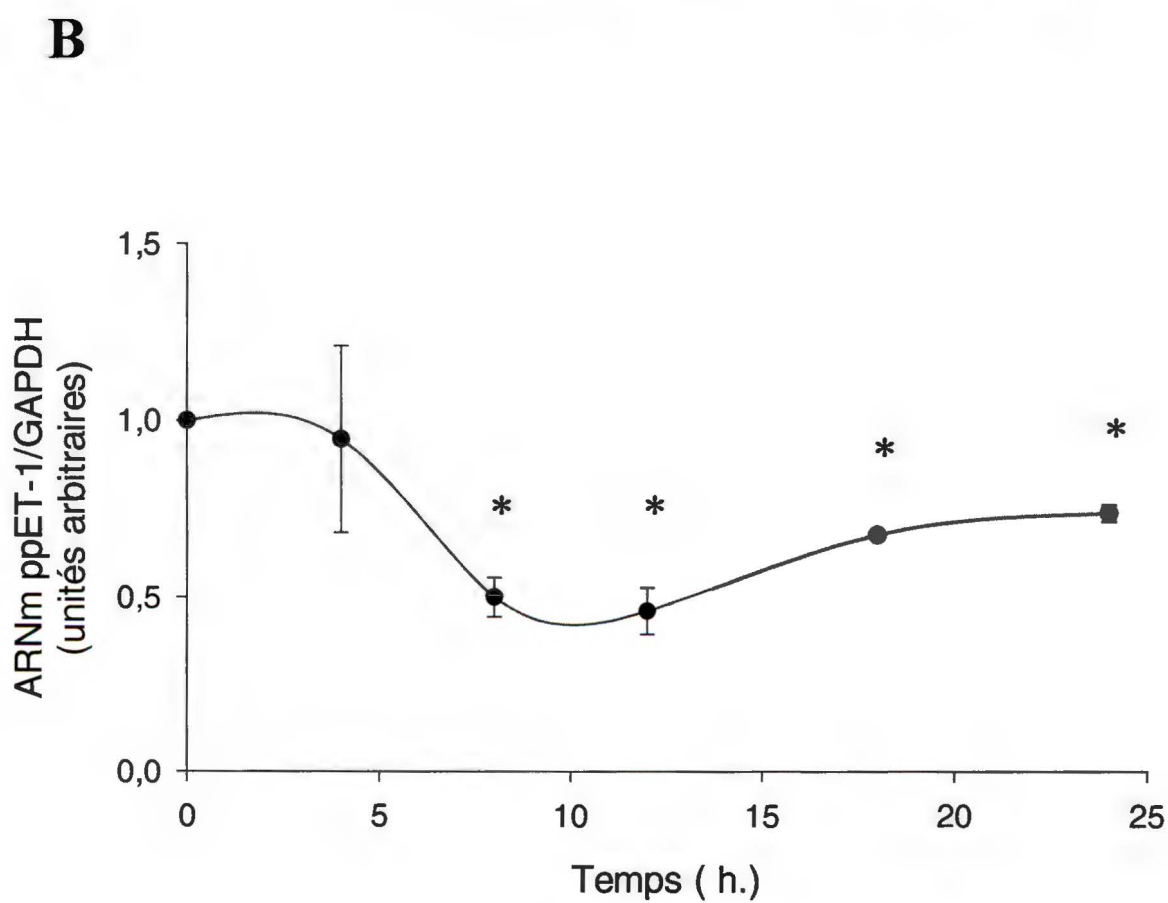
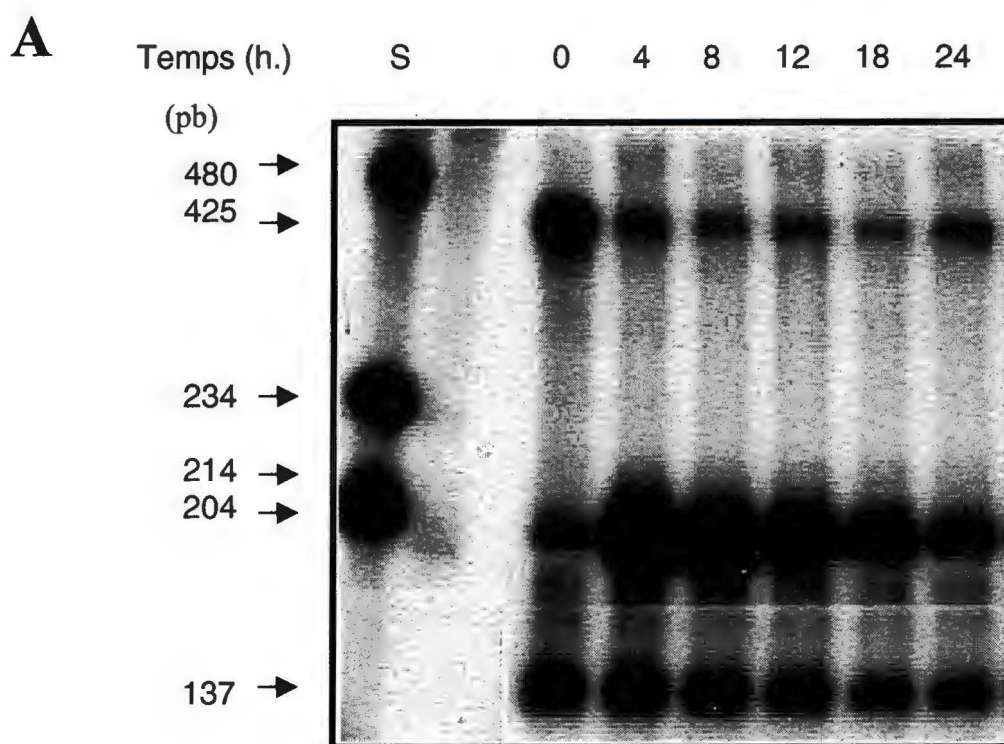
## **1. 4 Effet des glucocorticoïdes sur l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub> dans les CMLV et implication de la rétroaction négative par l'endothéline-1**

### **1. 4. 1 Les glucocorticoïdes diminuent l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub>**

Le traitement des CMLV quiescentes avec le RU 28362 (100 nM), cause une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> (Figure 12). Cette inhibition est observable dès 4 heures de traitement et est maximale après 12 heures avec une diminution de 0,5 fois par rapport au niveau contrôle. Cette diminution est transitoire et les niveaux d'ARNm reviennent graduellement vers les niveaux contrôles par la suite comme nous avons pu le déterminer par essai de protection des ARNm aux ARNases (Figure 12 A).

**Figure 12. Cinétique de temps de l'effet du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées en présence de 100 nM de RU 28362 pour 0 à 24 heures. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNm aux ARNases est effectué. Dans la figure A, les bandes à 480 et 425 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé du récepteur ET<sub>A</sub> respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH respectivement. L'hybridation a aussi été faite avec la sonde ppET-1 pour montrer la corrélation avec l'augmentation de l'expression de la ppET-1. Les bandes à 234 et 214 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de la ppET-1 respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 24 heures sur film XAR de Kodak. L'intensité relative des bandes ET<sub>A</sub> et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ET<sub>A</sub> /GAPDH. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard de trois expériences.

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)



#### **1. 4. 2 Le rétrocontrôle négatif par l'endothéline-1 est en partie responsable de la diminution de l'expression du gène ET<sub>A</sub> par les glucocorticoïdes**

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de synthèse de l'endothéline-1 induite par les glucocorticoïdes est responsable de la diminution des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> dans les CMLV, un antagoniste spécifique du récepteur ET<sub>A</sub>, le BQ 123, a été utilisé. L'expérience a été réalisée par traitement de 12 heures des CMLV, temps où l'on observe la diminution maximale des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> par le RU 28362 (Figure 12). Après 12 heures de traitement avec le RU 28362, on observe une diminution de moitié des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> (Figure 13). L'incubation des cellules avec le BQ 123 (5 µM) amène une augmentation de 4,4 fois des niveaux d'expression de ET<sub>A</sub>, révélant que ET-1 sécrété de façon basale chez ces cellules contribue à la diminution des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub>. La coincubation des CMLV avec le BQ 123 et le RU 28362 amène une augmentation de 2,1 fois des niveaux d'ARNm par rapport au niveau contrôle. Comme l'augmentation des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> par la coincubation avec le RU 28362 et le BQ 123 est inférieure à celle observée avec le BQ 123 seul, on peut penser que l'augmentation de l'endothéline-1, induite par les glucocorticoïdes, n'est pas la seule responsable de la diminution de l'expression du gène du récepteur mais qu'il existe un autre mécanisme d'action des glucocorticoïdes responsable de cette diminution.

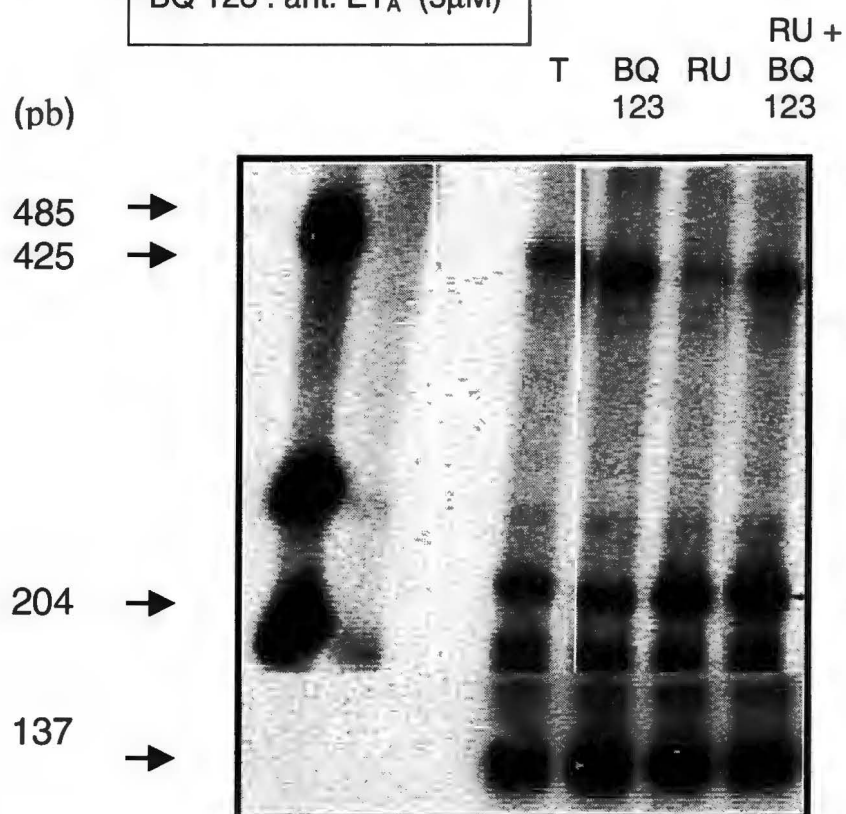
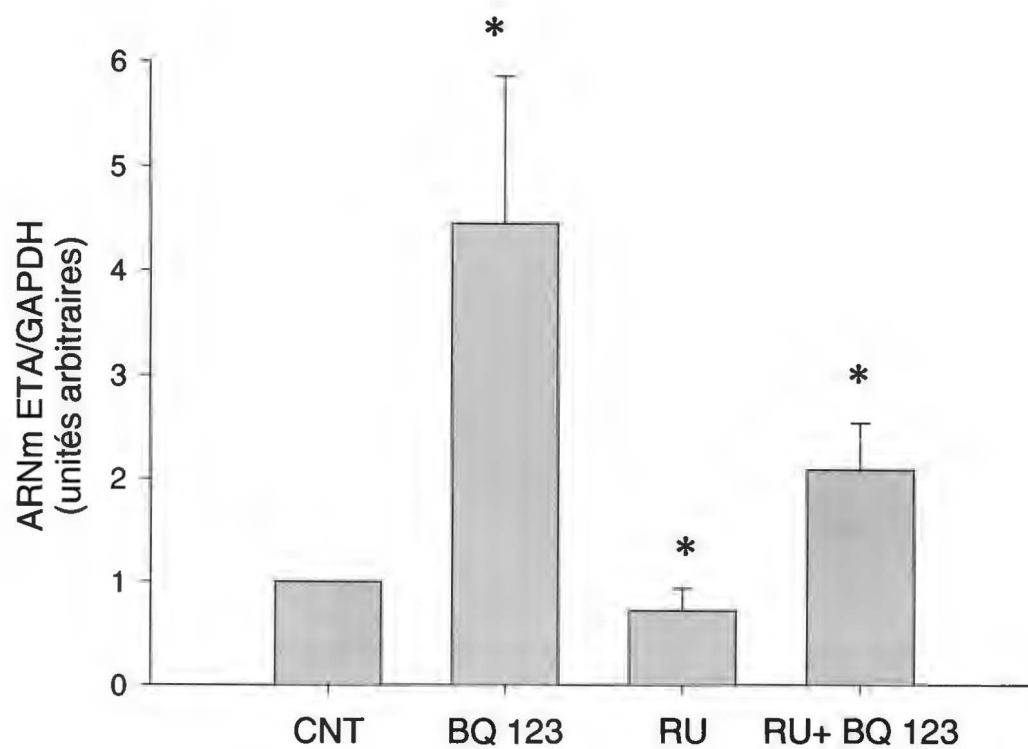
**Figure 13. Effet du BQ 123 et du RU 28362 sur l'expression de l'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> dans les CMLV.** Les CMLV quiescentes sont incubées avec le BQ 123 (5 µM), un antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub>, seul ou en présence de 100 ηM de RU 28362 pour une période de 12 heures. L'ARN total est ensuite récupéré et un essai de protection des ARNs aux ARNases est effectué. Les bandes à 480 et 425 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé du récepteur ET<sub>A</sub> respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 24 heures sur film XAR de Kodak. L'intensité relative des bandes ET<sub>A</sub> et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ET<sub>A</sub> /GAPDH. Les résultats sont la moyenne ± erreur standard de trois expériences.

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)



**A**

T : Témoin  
RU : RU 28362 (100nM)  
BQ 123 : ant. ET<sub>A</sub> (5μM)

**B**

## **2. ÉTUDES *IN VIVO* CHEZ LE RAT**

### **2. 1 Les glucocorticoïdes élèvent la pression artérielle chez le rat (traitement de 6 jours)**

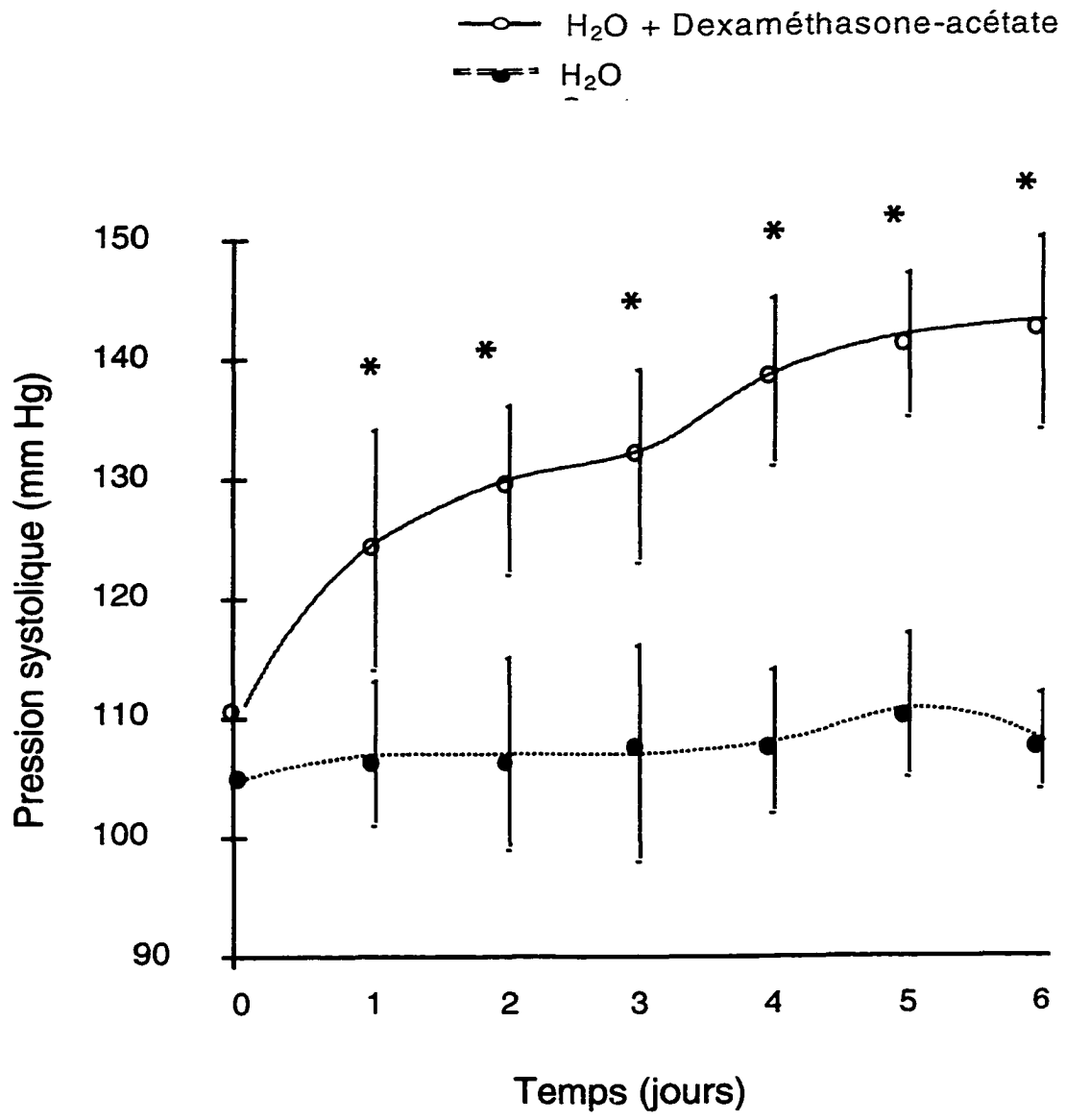
L'administration de dexaméthasone, un glucocorticoïdes synthétique, chez le rat provoque une augmentation de la pression artérielle. L'administration de dexaméthasone (2,5 mg/l dans l'eau à boire) pendant 6 jours résulte en une augmentation de 30 mm Hg de la pression systolique chez les rats (Figure 14). Cette augmentation est significative après un jour de traitement et atteint un plateau après 4 à 6 jours. Ce protocole a été utilisé auparavant par d'autres groupes pour élucider les mécanismes par lesquels les glucocorticoïdes régulent la pression artérielle (Okuno et *al.*, 1981 ; Sato et *al.*, 1994)

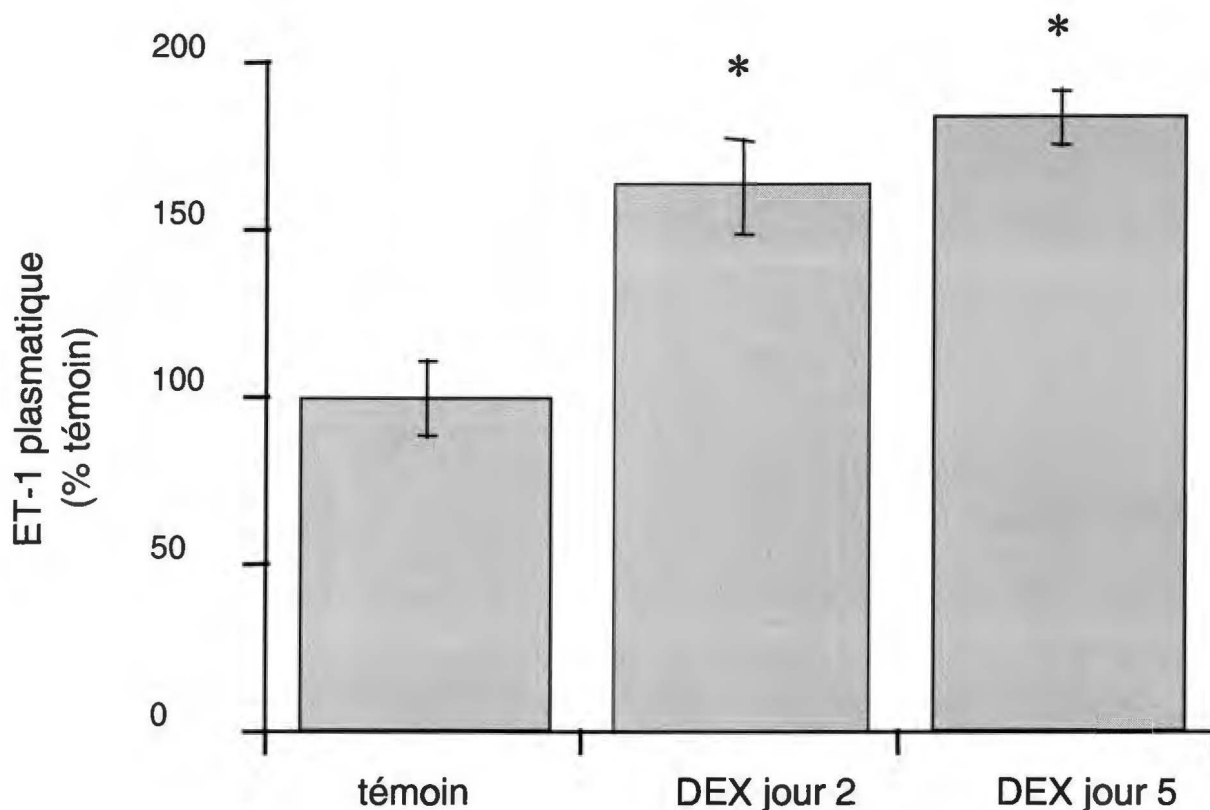
### **2. 2 Les glucocorticoïdes augmentent les niveaux d'endothéline-1 plasmatique chez le rat**

L'administration de dexaméthasone (2,5 mg/l dans l'eau à boire) résulte en une augmentation significative de 67% après 2 jours et 84% après 5 jours des niveaux d'endothéline ir plasmatique comme démontré à la figure 15. La valeur pour le témoin est de  $24,9 \pm 2,8$  fmol/ml et est supérieure à celle mentionnée dans la littérature ( $\sim 2$  fmol/ml). La mise au point de la technique de dosage est en cours dans le laboratoire.

**Figure 14. Effet de l'administration de dexaméthasone sur la pression systolique des rats (traitement de 6 jours).** Les rats Wistar (8 par groupe) reçoivent une diète normale et de l'eau *ad libitum*. Certains rats reçoivent de la dexaméthasone (2,5 mg/l) dans l'eau. La pression systolique est mesurée quotidiennement entre 07:00 et 08:30 heures. La pression systolique est mesurée de façon indirecte par la méthode "tail-cuff" (Byrom et Wilson, 1938) après avoir réchauffé les animaux. Les animaux sont acclimatés à cette manipulation pendant 3 jours précédant le début des expériences. Les résultats représentent la pression systolique des rats recevant de l'H<sub>2</sub>O (---) ou de la dexaméthasone (—). Les pressions systoliques ne changent pas de façon significative chez les rats témoins au cours du traitement. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  l'erreur standard de deux mesures de pression par rat (n = 8).

\* :  $p \leq 0,0001$  par rapport aux animaux au jour 0 (ANOVA).





**Figure 15. Effet de l'administration de dexaméthasone sur les niveaux d'endothéline-1 ir plasmatique chez les rats.** Les rats Wistar (6 par groupe) reçoivent une diète normale et de l'eau *ad libitum*. Certains rats reçoivent de la dexaméthasone (2,5 mg/l) dans l'eau. Au deuxième jours de traitement, la moitié des rats traités et la moitié des rats contrôles sont sacrifiés et exsangüinés. Le reste des rats sont sacrifiés au jours 5 de traitement. Le sang est recueilli et l'endothéline ir plasmatique est dosée par RIA à l'aide d'une trousse commerciale. Les résultats sont exprimés en pourcentage des témoins. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  l'erreur standard (n = 6).

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

## **2. 3 Effets des glucocorticoïdes sur l'expression des gènes de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'aorte de rat**

### **2. 3. 1 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 et diminuent l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub>**

L'administration de dexaméthasone (2,5mg/kg, i.p.) chez les rats (5 par groupe) sur une période de 0 à 24 heures a été réalisée afin de vérifier l'effet à court terme des glucocorticoïdes sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'aorte de rat. À la fin du traitement, les aortes ont été isolées et l'ARN extrait. La figure 16 A montre le résultat d'un essai de protection des ARNm aux ARNases.

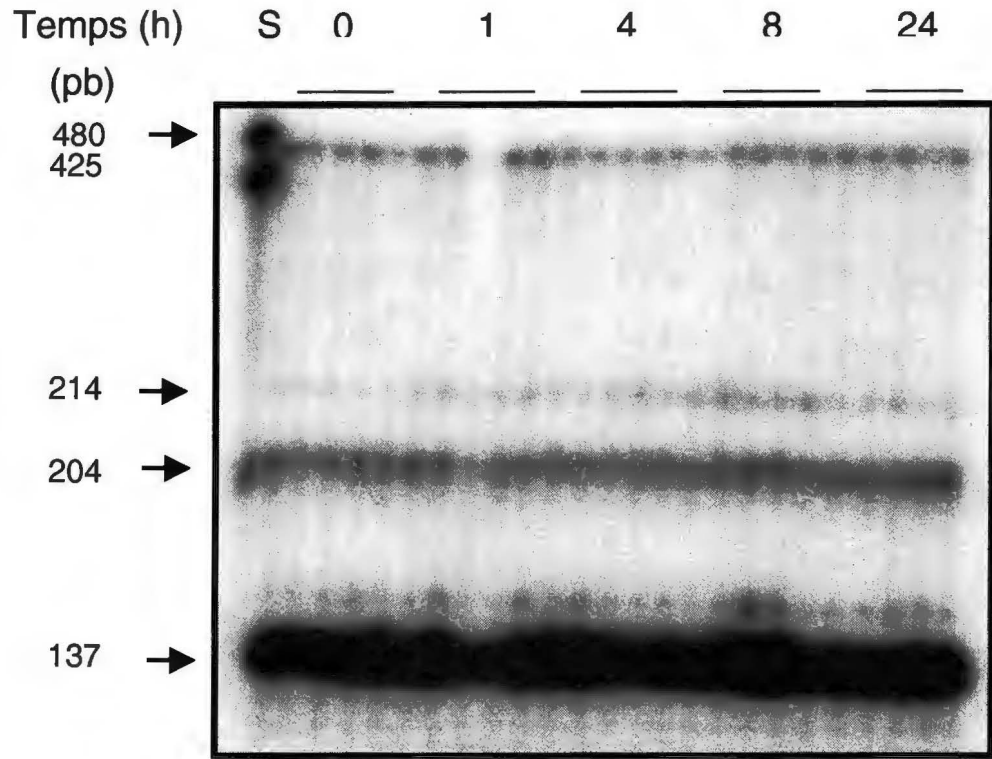
L'administration du glucocorticoïde synthétique cause une augmentation rapide et transitoire de l'expression de l'ARNm de ppET-1 dans l'aorte. Une augmentation significative est observée dès la première heure de traitement et est maximale à 8 heures avec une induction de 2,5 fois par rapport au contrôle (Figure 16 B). Les niveaux d'ARNm de la ppET-1 reviennent graduellement au niveau basal par la suite.

De leur côté, les niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub> sont diminués suite au traitement des rats avec les glucocorticoïdes . Une diminution maximale de 50% du niveau d'ARNm contrôle est observée à 4 heure après le traitement (Figure 16 B).

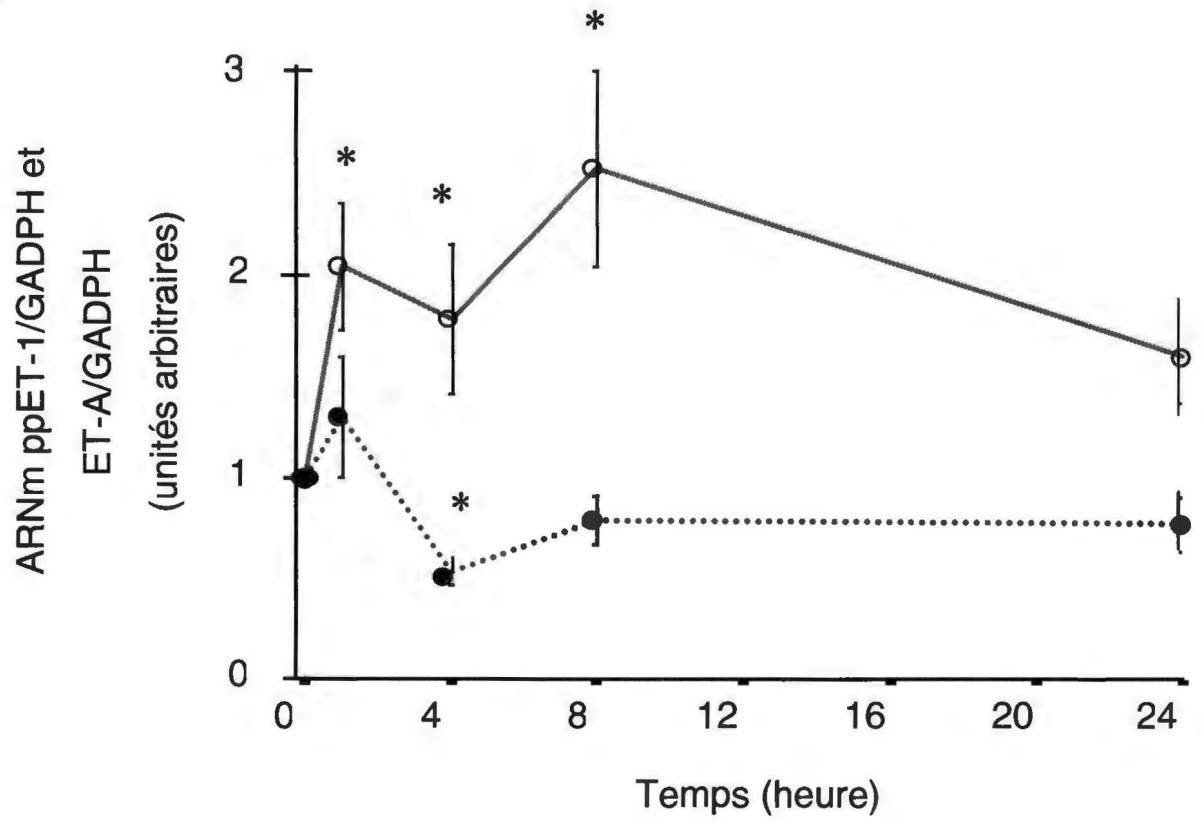
**Figure 16. Effet du dexaméthasone sur l'expression des ARNm de la ppET-1 et du récepteur ET<sub>A</sub> dans l'aorte de rat.** Vingt rats Wistar reçoivent une dose de 575 µg/kg de dexaméthasone-acétate par injection intrapéritonéale. Aux heures 0, 1, 4, 8 et 24, 5 rats sont sacrifiés et l'aorte est rapidement recueillie et congelée dans l'azote liquide. Les ARNs totaux sont extraits et les niveaux d'ARNs messagers encodants pour la ppET-1 et le récepteur ET<sub>A</sub> sont déterminés par essai de protection des ARNs messagers aux ARNases. Dans la figure A, les bandes à 480 et 425 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé du récepteur ET<sub>A</sub> respectivement. Les bandes à 234 et 214 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de ppET-1 respectivement. Les bandes à 204 et 137 nucléotides correspondent à la sonde pleine longueur et au fragment protégé de GAPDH respectivement. Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 36 heures sur film Biomax-MS de Kodak. L'intensité relative des bandes pp-ET-1, ET<sub>A</sub> et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ppET-1/GAPDH et ARNm ET<sub>A</sub> /GAPDH. Les résultats sont la moyenne ± erreur standard (n=5)

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

**A**



**B**





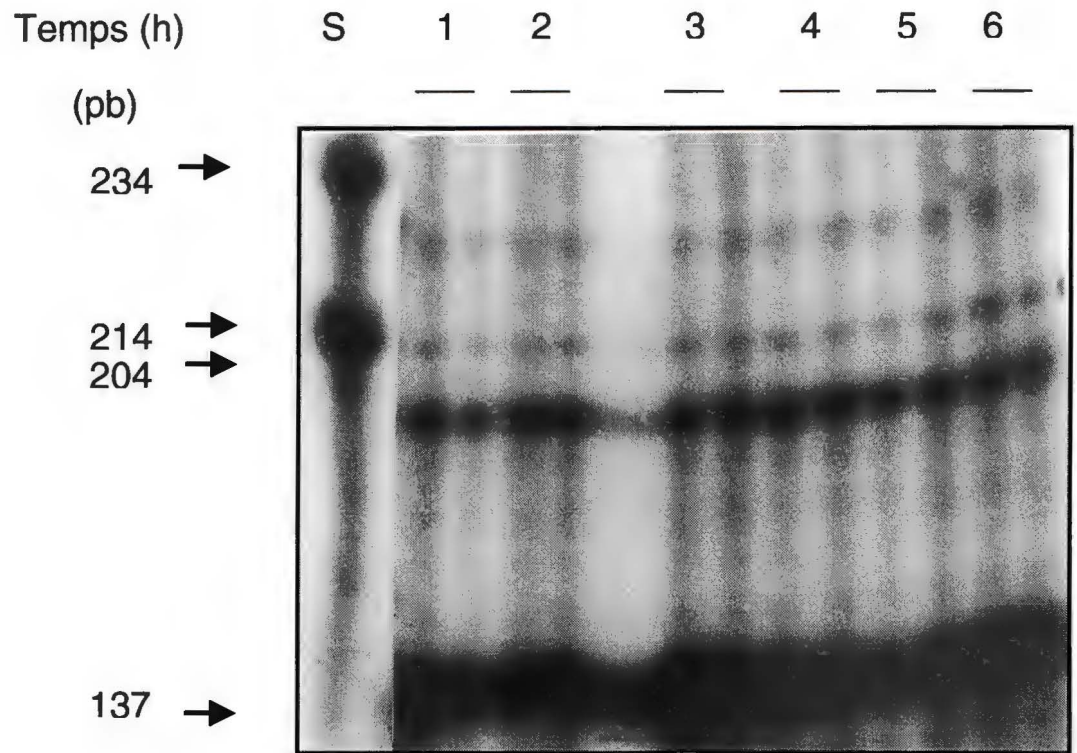
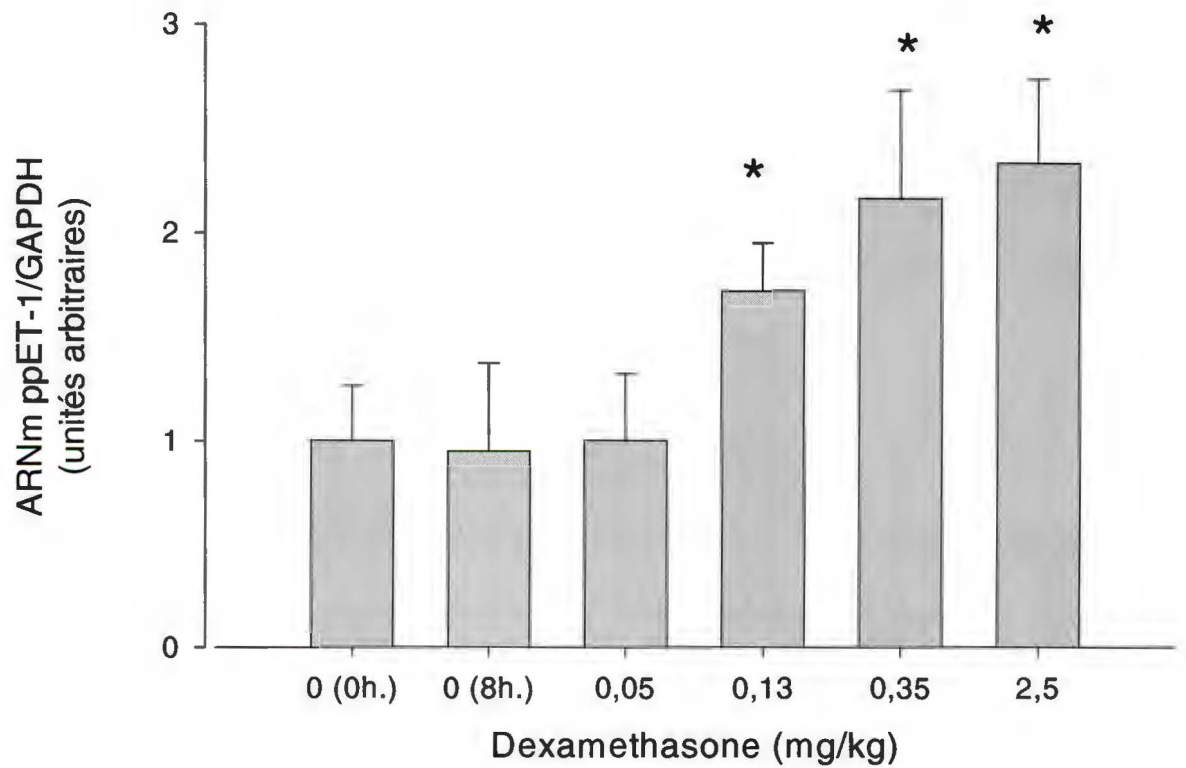
### **2. 3. 2 Les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 de façon dose-dépendante**

Les rats ont été traités avec différentes doses de dexaméthasone pendant 8 heures. C'est à 8 heures que la cinétique en fonction du temps a révélée une augmentation maximale des niveaux d'ARNm de la ppET-1 suite à un traitement avec le dexaméthasone (Figure 16). Les niveaux d'ARNm ont été déterminés par essai de protection des ARNm aux ARNases (Figure 17 A).

L'administration intrapéritonéale de dexaméthasone (0 à 2,5 mg/kg) pendant 8 heure cause une augmentation des niveaux d'ARNm de la ppET-1 de façon dose-dépendante (Figure 17 B). Un effet maximale de 2,3 fois est observé avec l'administration de 2,5 mg/kg de dexaméthasone. Un effet légèrement inférieur (2,2 fois) est observé avec l'administration de 0,35 mg/kg de dexaméthasone mais ce résultat n'est pas significativement différent de l'administration de 2,5 mg/kg. Les niveaux d'ARNm de la ppET-1 s'élèvent également avec un dose de 0,13 mg/kg mais non avec une dose de 0,05 mg/kg. Il n'y a pas de différence significative entre les niveaux d'ARNm de la ppET-1 chez les rats contrôles sacrifiés au moment de l'injection ou 8 heures plus tard.

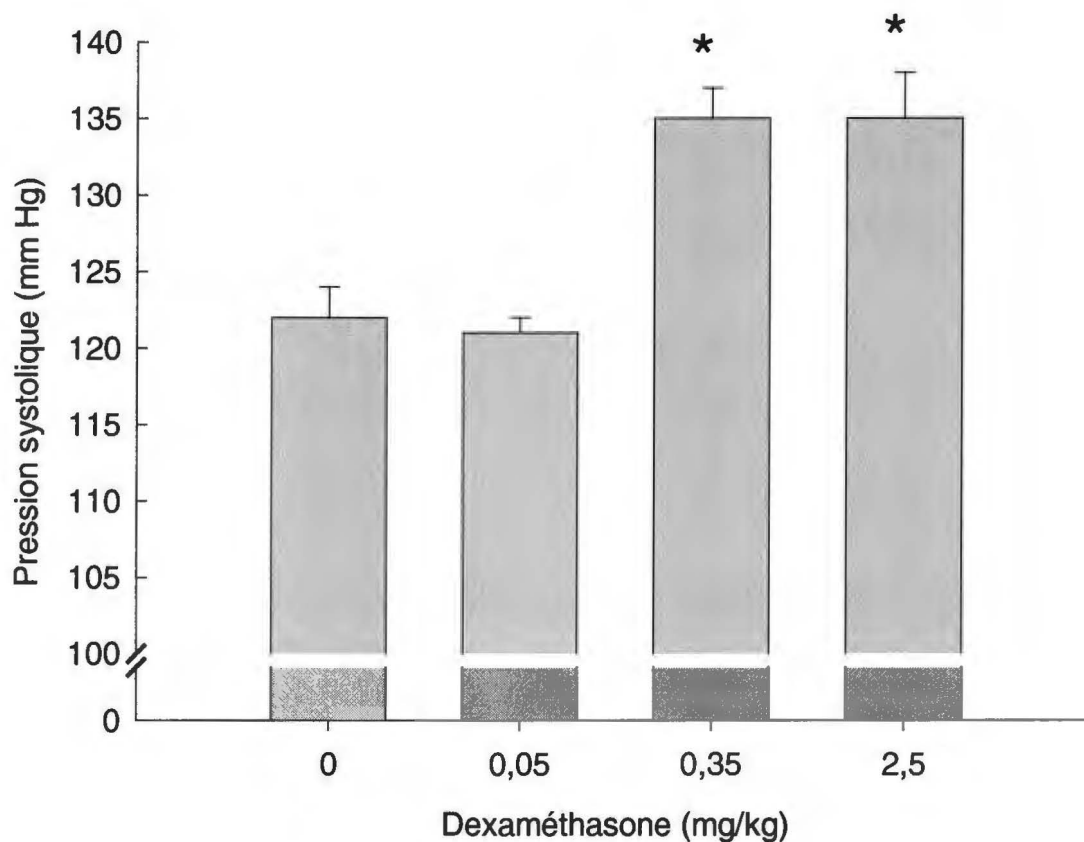
**Figure 17. Graphique dose-réponse de l'effet du dexaméthasone sur l'expression de l'ARNm de la ppET-1 dans l'aorte de rat.** Les rats (4 par groupe) reçoivent des doses 0 à 2,5 mg/kg de dexaméthasone par injection intrapéritonéale. Ils sont sacrifiés après 8 heures et l'aorte est rapidement recueillie et congelée dans azote liquide. 4 rats contrôles étaient sacrifiés au moment de l'injection. Les ARNs totaux sont extraits et les niveaux d'ARNs messagers encodants pour la ppET-1 sont déterminés par essai de protection des ARNs messagers aux ARNases (figure A). Après électrophorèse, le gel est exposé pendant 36 heures sur film Biomax-MS de Kodak. Seule la moitié des échantillons sont représentés sur le gel. L'intensité relative des bandes pp-ET-1 et GAPDH est mesurée par phosphorimager et analysée par logiciel informatique (Molecular Dynamics). La figure B représente le ratio de l'expression des ARNm ppET-1/GAPDH. Les résultats sont la moyenne  $\pm$  erreur standard (n=4).

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

**A****B**

### **2. 3. 3 Les glucocorticoïdes élèvent la pression artérielle chez le rat (traitement de 8 heures)**

Lors de l'expérience de l'effet dose-dépendant des glucocorticoïdes sur l'expression du gène de la ppET-1 dans l'aorte de rat, la pression artérielle des rats a été prise pour observer une corrélation entre les deux événements. L'administration de dexaméthasone chez le rat provoque une augmentation rapide de la pression artérielle. L'administration intrapéritonéale de dexaméthasone à des doses de 0,35 et 2,5 mg/kg pendant 8 heures résulte en une augmentation significative de 12 mm Hg de la pression systolique chez les rats (Figure 14). Une dose de 0,05 mg/kg de dexaméthasone ne modifie pas la pression artérielle.



**Figure 18. Effet de l'administration du dexaméthasone sur la pression systolique des rats (traitement de 8 heures).** Les rats Wistar (4 par groupe) reçoivent des doses de 0 à 2,5 mg/kg de dexaméthasone par injection intrapéritonéale. La pression systolique est mesurée de façon indirecte par la méthode "tail-cuff" (Byrom et Wilson, 1938) aux temps 0 et 8 heures, après avoir réchauffé les animaux. Les pressions systoliques entre les rats au temps 0 ne changent pas de façon significative (non représentées). Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  erreur standard de deux mesures de pression par rat ( $n = 4$ ) à 8 heures.

\* :  $p \leq 0.05$  vs. contrôle (ANOVA)

## DISCUSSION

Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans l'homéostasie du système cardio-vasculaire et en excès, ils causent l'hypertension. Les mécanismes amenant l'augmentation de la pression artérielle ne sont pas tout à fait élucidés. De son côté, l'endothéline-1 est impliquée dans le maintien du tonus vasculaire et est aussi associée à diverses maladies cardio-vasculaires. Les travaux présentés dans ce mémoire mettent en évidence un nouveau mécanisme par lequel les glucocorticoïdes pourraient affecter la pression artérielle soit la régulation de l'expression des gènes de la ppET-1 et de son récepteur ET<sub>A</sub>.

### 1. ÉTUDE *IN VITRO* CHEZ LES CMLV

#### 1. 1 Effet des glucocorticoïdes sur l'expression du gène de la ppET-1

Dans les CMLV, l'étude de la régulation par les glucocorticoïdes du gène de la ppET-1, un puissant peptide vasopresseur, est très importante. Nos résultats et ceux d'autres groupes (Kato et *al.*, 1995; Kanse et *al.*, 1991; Roubert et *al.*, 1990) démontrent que les glucocorticoïdes stimulent la sécrétion de l'endothéline-1 dans le milieu de culture des CMLV. Dans cette partie du projet de recherche, nous avons élucidé le mécanisme d'action des glucocorticoïdes responsable de cette augmentation de sécrétion de l'endothéline-1.

Nos résultats démontrent que l'expression du gène de la ppET-1 est augmentée dès la première heure de traitement au RU 28362 et pour revenir graduellement vers le niveau de base par la suite. L'effet des glucocorticoïdes sur les niveaux d'expression de l'ARNm de la ppET-1 est donc rapide et transitoire. Nous avons également démontré que cette induction est dose-dépendante et qu'elle est causée par la liaison du RU 28362 aux récepteurs de type II des glucocorticoïdes. La cinétique de temps et les niveaux d'induction de l'expression du gène de la ppET-1 par les glucocorticoïdes sont similaires à celles observées avec d'autres stimulateurs de l'expression du gène de la ppET-1 comme : la thrombine (Marsden et *al.*, 1995 ; Kitazumi et Tasaka, 1993), le TGF $\beta$  (Kurihara et *al.*, 1989), le TNF $\alpha$  (Marsden et Brenner, 1992), la bradykinine (Marsden et *al.*, 1991), les esters de phorbol (Marsden et *al.*, 1995 ; Kitazumi et Tasaka, 1993 ; Marsden et *al.*, 1991 ; Yanagisawa et *al.*, 1989), l'insuline (Oliver et *al.*, 1991) et l'interleukine-1 (Yoshizumi et *al.*, 1990).

De plus, ces résultats suggèrent que les glucocorticoïdes modulent l'expression de l'endothéline-1 avec une spécificité tissulaire puisqu'ils n'ont pas d'effet ou même inhibent l'expression de la ppET-1 dans d'autres types cellulaires (Kanase et *al.*, 1991; Calderon et *al.*, 1994; Laporte et *al.*, 1995; Vittori et *al.*, 1992). Les mécanismes expliquant la régulation spécifique dans les tissus ne sont pas connus. Les différentes conditions expérimentales pourraient être en partie responsables. Les CMLV sont un type cellulaire utilisé par nous et bien d'autres groupes dans l'étude des mécanismes impliqués dans l'hypertension. Cependant, les cellules endothéliales jouent un rôle important dans le

contrôle des variations de pression artérielle et la lumière devra être fait sur la régulation de l'expression de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes dans ces cellules.

Après avoir démontré que les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 chez les CMLV, l'étude du mécanisme d'action responsable de cette induction s'est avérée intéressante. Les glucocorticoïdes sont connus pour réguler l'expression de gènes par une variété de mécanismes (Beato et *al.*, 1989). Le mécanisme le plus observé est l'altération de la transcription. Cependant, il existe une multitude de modifications post-transcriptionnelles incluant le coiffage de l'extrémité 5', la méthylation, la polyadénylation et l'épissage (Nevins, 1983). Les glucocorticoïdes peuvent donc non seulement augmenter le niveau des messagers en affectant leur transcription mais aussi en affectant leur stabilité. Dans notre étude, l'effet des glucocorticoïdes sur la stabilité de l'ARNm de ppET-1 est examiné en utilisant un inhibiteur de l'ARN polymérase : l'actinomycine D. Cette expérience nous révèle que la demi-vie de l'ARNm de la ppET-1 n'est pas modifiée par le traitement aux glucocorticoïdes. Elle est d'environ 18-20 minutes comme observé initialement par Inoue et *al.* (1989). Ces observations indiquent qu'aucune altération de la stabilité des messagers n'est impliquée dans l'induction de l'expression du gène de ppET-1 par les glucocorticoïdes suggérant du même coup, que l'altération transcriptionnelle est en cause. Ceci a été confirmé par l'essai de transcription nucléaire dans lequel la transcription de la ppET-1 est clairement augmentée dès 15 minutes de traitement avec le RU 28362 et l'induction des messagers est similaire à celle observée dans la cinétique de temps.



Les glucocorticoïdes peuvent induire la transcription de gènes directement par la liaison de leur récepteur activé sur le promoteur de ces gènes. Cependant, des mécanismes alternatifs comme l'augmentation de synthèse de nouvelles protéines inductrices (comme par exemple c-fos ou c-jun) peuvent être à l'origine de ces augmentations. Pour clairement définir si ce mécanisme était impliqué dans l'augmentation des messagers de la ppET-1 par les glucocorticoïdes, les cellules ont été incubées avec un inhibiteur de la traduction des protéines. Puisque l'induction des messagers de la ppET-1 par le RU 28362 est observable même après le traitement des cellules avec la cycloheximide, cela indique que la synthèse de nouvelles protéines n'est pas nécessaire à cette induction. A noter aussi que les niveaux d'ARNm de la ppET-1 en présence de la cycloheximide seule sont plus élevés que les niveaux de base. Il a été montré que l'extrémité 3' du message de la ppET-1 contient des motifs "AUUUA" et AUn qui lui confèrent une instabilité, probablement causée par une susceptibilité accrue aux ARNases (Inoue et *al.*, 1989; Chen et Shyu, 1995). Cette instabilité est cependant dépendante de la traduction. Comme le rôle de la cycloheximide est de bloquer la traduction, elle confère indirectement une stabilité aux ARNm (Chen et Shyu, 1995).

En résumé, cette première partie de notre approche expérimentale démontre que les glucocorticoïdes stimulent l'expression du gène de la ppET-1 de façon rapide et transitoire dans les CMLV. Cette stimulation n'affecte pas la demi-vie des messagers et est entièrement attribuable à la transcription *de novo*. Enfin, la synthèse protéique n'est pas impliquée dans cette induction. Les mécanismes amenant l'augmentation de la transcription *de novo* de la ppET-1 par les glucocorticoïdes restent à déterminer. Nous avons identifié une séquence semblable à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes dans

le promoteur du gène de la ppET-1 ce qui suggère une action directe du récepteur activé sur le promoteur.

L'augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes démontrée ici peut avoir des effets physiologiques sur les CMLV : par exemple, une augmentation de la contraction et des effets mitogéniques de l'endothéline-1. Également, les glucocorticoïdes inhibent les effets vasorelaxants de l'endothéline-1 en inhibant la production de l'oxyde nitrique et des prostacyclines dans les cellules endothéliales. Ensemble, ces actions résultent en un effet potentialisateur de la vasoconstriction de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes et pourraient expliquer, en partie du moins, l'augmentation de la pression artérielle observée lors d'un excès de glucocorticoïdes.

## **1. 2 Effet des glucocorticoïdes sur l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub> dans les CMLV et implication de la rétroaction négative par l'endothéline-1**

Des études antérieures ont démontré que les glucocorticoïdes diminuent les récepteurs ET<sub>A</sub> chez les CMLV sans changer l'affinité pour l'endothéline-1 (Provencher et *al.*, 1995 ; Nambi et *al.*, 1992 ; Roubert et *al.*, 1993 ; Kato et *al.*, 1995). Il est raisonnable de penser qu'une partie de la diminution des récepteurs peut être attribuable à la forte liaison et à la dissociation lente de l'endothéline-1, induite par les glucocorticoïdes, à ses récepteurs,

comme il a été démontré par l'équipe de Roubert et *al.* (1993). Cependant, nos résultats démontrent que l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub> est aussi diminuée. Cet effet des glucocorticoïdes de diminuer l'expression des récepteurs d'un agent vasopresseur est très surprenant puisqu'il va à l'encontre de leurs effets hypertenseurs. Nous avons donc envisagé l'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif exercé par l'endothéline-1, induit par les glucocorticoïdes, sur l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub>. Un effet semblable a déjà été observé avec l'angiotensine II sur l'expression du gène de son récepteur ATI (Makita et *al.*, 1992). Pour vérifier cette hypothèse, les CMLV ont été traitées avec un antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub>, le BQ 123. Nos résultats démontrent que l'utilisation de cet antagoniste, seul, augmente l'expression des niveaux d'ARNm du récepteur ET<sub>A</sub>. Ceci confirme que le rétrocontrôle négatif exercé par l'endothéline-1, synthétisée de façon basale par les CMLV, est impliqué dans la diminution d'expression du récepteur ET<sub>A</sub>. Cependant, il est clair qu'un autre mécanisme est impliqué dans la régulation à la baisse de l'expression du gène ET<sub>A</sub> puisque la coincubation de l'antagoniste et du RU 28362 ne permet pas de reproduire l'augmentation de l'expression de la ppET-1 observée avec l'antagoniste seul. Le second mécanisme implique probablement l'action directe du récepteur activé des glucocorticoïdes au promoteur du gène ET<sub>A</sub> ou sur le gène d'une protéine qui affecterait l'expression du récepteur. Ceci reste à déterminer. Nous n'avons pu identifier de séquences consensus à l'élément de réponse aux glucocorticoïdes dans la séquence clonée du promoteur du gène ET<sub>A</sub>.

La résultante de l'effet des glucocorticoïdes (augmentation de l'expression de la ppET-1 et diminution de l'expression des récepteurs ET<sub>A</sub>) sur l'action de l'endothéline-1 chez les CMLV demeure à être élucidée.

## 2. ETUDE *IN VIVO* CHEZ LE RAT

Nos résultats et ceux d'autres groupes (Okuno et *al.*, 1981 ; Clarke et *al.*, 1968 ; Elijovich et *al.*, 1980 ; Haack et *al.*, 1977 ; Knowlton et *al.*, 1952 ; Krakoff et *al.*, 1975 ; Ogawa et *al.*, 1965 ; Whitworth et *al.*, 1979) démontrent que l'administration de dexaméthasone à des rats normotendus et sur diète normale amène une augmentation rapide de la pression artérielle observable dès le premier jour de traitement.

Cette augmentation rapide de la pression artérielle est bien caractéristique d'un excès de glucocorticoïdes contrairement à l'hypertension induite par les minéralocorticoïdes qui est habituellement plus lente i.e. 3 à 4 jours et qui nécessite une diète supplémentée en sel (Whitworth et *al.*, 1979).

Dans la première partie du projet, nous avons démontré que les glucocorticoïdes augmentent l'expression et la sécrétion de l'endothéline-1 et diminuent l'expression du gène ET<sub>A</sub> *in vitro* chez les CMLV. Dans cette deuxième partie, nous démontrons que les glucocorticoïdes augmentent de façon rapide l'expression du gène de la ppET-1 et diminuent l'expression du gène ET<sub>A</sub> *in vivo* dans l'aorte de rat. Ces effets sont accompagnés d'une élévation de la pression artérielle, suggérant que l'augmentation de l'expression de la ppET-1 y est impliquée.

Nous avons donc démontré pour la première fois que les glucocorticoïdes augmentent l'expression du gène de la ppET-1 *in vivo* dans un tissu vasculaire. Comme l'endothéline-1 est régulée au niveau de la transcription, l'augmentation de l'expression de la ppET-1 corrèle fort probablement avec une élévation de la synthèse du peptide et de son action vasopressive. En effet, dans un traitement aux glucocorticoïdes à plus long terme (5 jours), nous avons démontré une élévation des niveaux d'endothéline-1 plasmatique chez le rat.

L'augmentation de l'expression de la ppET-1 et la diminution du récepteur ET<sub>A</sub> observées *in vitro* et *in vivo* peuvent sembler contradictoires. Cependant, sachant que l'endothéline-1 est un agent vasopresseur très puissant (le plus puissant découvert jusqu'à maintenant), et qu'il peut possiblement agir pendant plusieurs heures puisqu'il reste fortement lié à ses récepteurs, la diminution des récepteurs pourrait être un mécanisme compensatoire pour éviter les effets vasopresseurs trop importants. L'utilisation d'un antagonistes des récepteurs ET<sub>A</sub> *in vivo* chez le rat nous permettra de vérifier si l'augmentation de l'expression de la ppET-1 et l'augmentation du peptide dans le plasma sont impliquées dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes. Plusieurs équipes ont d'ailleurs déjà réalisé des expériences semblables *in vivo* en utilisant des antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1 dans le but d'élucider le rôle de ce peptide dans l'hypertension (d'Uscio et *al.*, 1997a ; d'Uscio et *al.*, 1997b ; Moreau et *al.*, 1997). Ceux-ci ont aussi démontré un effet hypertenseur dû à l'élévation de l'endothéline-1 malgré une diminution des récepteurs ET<sub>A</sub>.

Cette discussion ne serait pas complète sans parler de l'implication possible des récepteurs ET<sub>B</sub> dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes. En plus de médier la relâche de facteurs relaxants (NO, Prostacyclines) au niveau des cellules endothéliales, il a été démontré que des récepteurs ET<sub>B</sub> étaient aussi présents dans les CMLV des artères de résistance et des veines chez le rat et qu'ils pouvaient induire la vasoconstriction (Moreland et *al.*, 1992 ; Sumner et *al.*, 1992 ; Moreland et *al.*, 1994 ; Sudjarwo et *al.*, 1994). Leur contribution dans l'augmentation de la pression artérielle par ET-1 est cependant encore obscure (Davenport et Maguire, 1994). Il est possible que ces récepteurs « vasoconstricteurs » participent partiellement à la hausse de pression artérielle observée chez nos rats traités aux glucocorticoïdes. Peut-être même seraient-ils modulés pour compenser la perte des récepteurs ET<sub>A</sub> sur l'aorte? Jusqu'à maintenant, peu de données sont disponibles quant à l'effet des glucocorticoïdes sur les récepteurs ET<sub>B</sub> hormis une étude réalisée dans l'hypothalamus et le cervelet de rat qui démontrait une baisse de l'expression de ces récepteurs (Shibata et *al.*, 1995). Il sera donc important de vérifier l'effet des glucocorticoïdes sur les récepteurs ET<sub>B</sub> à la fois au niveau des cellules endothéliales et au niveau des artères de résistance. La résultante entre l'action vasodilatatrice et vasoconstrictrice médiée par ce récepteur dans l'hypertension induite par les glucocorticoïdes chez le rat pourra être évaluée en utilisant un antagoniste spécifique à ces récepteurs.

### 3. CONCLUSION

En conclusion, ces travaux ont permis de démontrer que les glucocorticoïdes augmentent de façon rapide et transitoire l'expression du gène de la ppET-1 dans un type cellulaire important dans les variations de pression artérielle : les CMLV. Cette augmentation de l'expression est entièrement attribuable à une augmentation de la transcription *de novo* du gène et la synthèse protéique n'est pas impliqué dans cette induction.

D'autre part, les travaux ont permis de démontrer que les glucocorticoïdes diminuent l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> chez les CMLV. La rétroaction négative exercée par l'endothéline-1 est en partie responsable de la diminution de l'expression du récepteur mais un autre mécanisme est impliqué.

En dernier lieu, les études réalisées *in vivo* dans l'aorte de rat ont permis de démontrer que les glucocorticoïdes augmentent aussi de façon rapide et transitoire l'expression du gène de la ppET-1 et diminuent l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub> dans un tissu vasculaire. L'augmentation de l'expression du gène de la ppET-1 est dose-dépendante et est accompagnée d'une élévation de la pression artérielle. Un traitement à plus long terme a permis de démontrer une augmentation des niveaux d'endothéline-1 plasmatique chez les rats traités aux glucocorticoïdes.

L'endothéline-1 est un agent vasopresseur puissant. Une élévation des niveaux plasmatiques de ce peptide est associée à diverses pathophysiologies cardio-vasculaires. L'augmentation de l'expression et de la synthèse de ce peptide par les glucocorticoïdes démontrée dans les CMLV de l'aorte *in vitro* et *in vivo* chez le rat éveillé, pourrait être un mécanisme nouveau et important, responsable de l'augmentation de la pression artérielle observée chez les rats traités avec ce stéroïde.

#### 4. PERSPECTIVES

Des expériences restent à être effectuées dans le but d'élucider l'importance de la régulation par les glucocorticoïdes de l'endothéline-1 et de ses récepteurs. D'abord, du côté des CMLV en culture, des études plus poussées nous permettront d'élucider le mécanisme d'action des glucocorticoïdes amenant l'augmentation de la transcription de la ppET-1. Ces études nous permettront de déterminer si cette induction est réalisée par un modèle classique de l'action des stéroïdes i.e. liaison du récepteur des glucocorticoïdes activé à un GRE ou si un mécanisme plus complexe est impliqué, comme il est parfois le cas dans la régulation des cytokines. Les interactions protéine-ADN devront être déterminées par des rétentions sur gels et des études de transfection cellulaires avec le promoteur de la ppET-1 devront aussi être réalisées.

Du côté de la régulation de l'expression du gène du récepteur ET<sub>A</sub>, des études similaires à celles mentionnées ci-haut (rétentions sur gels et transfection cellulaire)



devront être réalisées pour déterminer s'il y a ou non interaction entre les récepteurs activés des glucocorticoïdes et le promoteur du gène  $ET_A$ , pouvant réprimer son expression.

Des études devront aussi être effectuées dans les cellules endothéliales, qui sont aussi des cellules très importantes dans les variations de pression artérielle. Les deux études présentées jusqu'à maintenant sur la régulation de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes dans ce type cellulaire proviennent d'espèces différentes (bovin et humain) et les résultats sont opposés. Des divergences dans les protocoles expérimentaux pourraient expliquer ces différences et la lumière devra être faite en utilisant des cellules endothéliales de rats et humaines dans nos conditions expérimentales. L'étude de la régulation des récepteurs  $ET_B$  devra aussi être entreprise sur ces cellules ainsi que dans les artères de résistance.

Ensuite, l'ultime projet est de vérifier s'il existe oui ou non une corrélation entre l'élévation de l'expression et du peptide ET-1 et l'élévation de la pression artérielle observée chez les rats traités aux glucocorticoïdes. Ceci devra être réalisé en utilisant des antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1.

Finalement, on sait que l'hypertension s'accompagne la plupart du temps d'une croissance anormale des cellules vasculaires. L'endothéline-1 manifeste des propriétés mitogéniques et hypertrophiques chez les CMLV (Masaki, 1993 ; Chua et *al.*, 1992). Il serait intéressant de vérifier si l'augmentation de la synthèse de l'endothéline-1 par les glucocorticoïdes est impliquée dans la croissance anormale des CMLV.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, Dre Patricia Provencher, pour m'avoir permis de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir encouragé tout au long de mon projet. J'aimerais aussi remercier les Drs Guylain Boissonneault et Pedro d'Orléans-Juste pour leur précieuse contribution à la correction de mon mémoire et ce dernier pour nous avoir gracieusement fourni le BQ 123. Aussi, le Dr Claude Asselin et son étudiant François Boudreau pour leur expertise dans les « run-on ». Finalement, Annie Villeneuve et Claudie Bernier pour leurs nombreux encouragements et leur agréable compagnie.

## RÉFÉRENCES

- Adner, M., Uddman, E., Cardell, L.O. et Edvinsson, L. (1998) Regional variation in appearance of vascular contractile endothelin-B receptors following organ culture. *Cardiovasc. Res.* **37** : 254-262.
- Alberts, G.F., Peifley, K.A., Johns, A., Kleha, J.F. et Winkles, J.A. (1994) Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J. Biol. Chem.* **269** (13) : 10112-10118.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. et Nakanishi, S. (1990) Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* **348** (6303) : 730-732.
- Aubert, J.D., Juillerat-Jeanneret, L. et Leuenberger, P. (1997) Expression of endothelin-1 in human broncho-epithelial and monocytic cell lines: influence of tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone. *Biochem. Pharmacol.* **53** (4) : 547-552.
- Awazu, M., Sugiura, M., Inagami, T., Ichikawa, T. et Kon, V. (1991) Cyclosporin promotes glomerular binding *in vivo*. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1** : 1253-1258.
- Badr, K. F., Murray, J.J., Breyer, M. D., Takahashi, K., Inagami, T., Harris, R. C. (1989) Mesangial cell, glomerular and renal vascular resistance response to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J. Clin. Invest.* **83** : 336-42
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M. et Chrousos, G.P. (1996) Molecular Determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews* **17** (3) : 245-261.
- Barber, D.A., Michener, S.R., Ziesmer, S.C. et Miller, V.M. (1996) Chronic increases in blood flow upregulate endothelin-B receptors in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **270** (1 pt 2) : H65-H71

- Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* **56** : 335-344.
- Binkley, S.A. (1995) Endocrinology. Harper Collins College Publishers, New York, 539 p.
- Bloch, K.D., Friedrich, S.P., Lee, M.E., Eddy, R.L., Shows, T.B. et Quertermous, T. (1989) cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin-3. *J. Biol. Chem.* **264** (18) : 18156-61.
- Botting, R.M. et Vane, J.R. (1990) Endothelins: potent releasers of prostacyclin and EDRF. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **42** (3) : 203-218.
- Boulanger, C. et Luscher, T.F. (1990) Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* **85** (2) : 587-590.
- Boulanger, C.M., Tanner, F.C., Bea, M.L., Hahn, A.W., Werner, A. et Luscher, T.F. (1992) Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ. Res.* **70** (6) : 1191-1197.
- Byrom, F. et Wilson, C. (1938) A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J. Physiol.* **93** : 301-304.
- Cairnes, H. S., Rogerson, M. E., Fairbanks, L. D., Westwick, J., Neild, G. H. (1988) Endothelin and cyclosporin nephrotoxicity. *Lancet* **2** : 1496-97
- Cairnes, H. S., Rogerson, M. E., Fairbanks, L. D., Westwick, J., Neild, G. H. (1989) Endothelin induces an increase in renal vascular resistance and a fall in glomerular filtration rate in the rabbit isolated perfused kidney. *Br. J. Pharmacol.* **98** : 155-160
- Calderon, E., Gomez-Sanchez, C.E., Cozza, E.N., Zhou, M., Coffey, R.G., Lockey, R.F., Prockop, L.D. et Szentivanyi, A. (1994) Modulation of endothelin-1 production by a pulmonary epithelial cell line. I. Regulation by glucocorticoids. *Biochem. Pharmacol.* **48** (11) : 2056-2071.
- Cato, A. B. C. et Wade, E. (1996) Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BioEssays* **18** : 371-378.

- Cavero, P.G., Miller, W.L., Heublin, D.M., Margulies, K.B. et Burnett, J.C., Jr. (1990). Endothelin in experimental congestive heart failure in the anesthetized dog. *Am. J. Physiol.* **259** : F312-F317.
- Chen, C.-Y. A., Shyu, A.-B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 20 (11): 465-470.
- Chua, B. H. L., Krebs, C. J., Chua, C. C., Diglio, C. A. (1992) Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **262** : E412-E416.
- Clarke, T.D., Ashburn, A.D. et Williams, W.L. (1968) Cortisone-induced hypertension and cardiovascular lesions in mice. *Am. J. Anat.* **123** : 429.
- Cody, R. J., Haas, G. J. , Binkley, P. F., Capers, Q., Kelly, R. (1992) Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with congestive heart failure. *Circulation* **85** : 504-9
- Cristiani, C., Volpi, D., Landonio, A. et Bertolero, F. (1994) Endothelin-1-selective binding sites are downregulated by transforming growth factor-beta and upregulated by basic fibroblast growth factor in a vascular smooth muscle-derived cell line. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **23** (6) : 988-994.
- Cristol, J.P., Warner, T.D., Thiemermann, C. et Vane, J.R. (1993) Mediation via different receptors of the vasoconstrictor effects of endothelins and sarafotoxins in the systemic circulation and renal vasculature of the anaesthetized rat. *Br. J. Pharmacol.* **108** (3) : 776-779.
- Croxtall, J.D., Choudhury, Q., Newman, S. et Flower, R.J. (1996) Lipocortin 1 and the control of cPLA2 activity in A549 cells. Glucocorticoids block EGF stimulation of cPLA2 phosphorylation. *Biochem Pharmacol* **52** (2) : 351-356.
- Davenport, A. P., Kaumann, A. J., Hall, J.A., Nunez, D. J., Brown, M. J. (1989) [<sup>125</sup>I] Endothelin binding in mammalian tissues : relation to human atrial inotropic effects and coronary contraction. *Br. J. Pharmacol.* **96** : 102 p.

- Davenport, A.P. et Maguire J. (1994) Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ET<sub>A</sub> receptors in humans ? *Trends Pharmacol. Sci.* **15** : 9-11.
- Davenport, A. P., O'Reilly, G., Molennar, P., Maguire, J.J., Kue, R.E., Sharkey, A., Bacon, C.R. et Ferro, A. (1993) Human endothelin receptors characterised using reverse transcriptase-polymerase chain reaction, in-situ hybridisation, and subtype-selective ligands BQ123 and BQ3020 : evidence for expression of ET<sub>B</sub> receptors in human vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22** (suppl.8) : S22-S25.
- de Nucci, G., Thomas, R., D'Orléans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D. et Vane, J.R. (1988) Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85** (24) : 9797-8000.
- Deray, G., Carayon, A., Maistre, G., Benhmida, M., Masson, F. Barthelemy, C., Petitclerc, T. et Jacobs, C. (1992). Endothelin in chronic heart failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **7** : 300-305.
- Eguchi, S., Hirata, Y., Ihara, M., Yano, M., Marumo, F. (1992) A novel ETA antagonist (BQ-123) inhibits endothelin-1-induced phosphoinositide breakdown and DNA synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **302** : 243-6
- Elijovich, F. et Krakoff, L.R. (1980) Effect of converting enzyme inhibition on glucocorticoid hypertension in the rat. *Am. J. Physiol.* **238** : H844
- Emori, T., Hirata, Y., Imai, T., Eguchi, S. et Kanno, K. (1993) Cellular mechanism of natriuretic peptides induced inhibition of endothelin-1 biosynthesis in rat endothelial cells. *Endocrinology* **133** : 2474-2480.
- Emori, T., Hirata, Y., Imai, T., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S. et Marumo, F. (1992) Cellular mechanism of thrombin on endothelin-1 biosynthesis and release in bovine endothelial cell. *Biochem. Pharmacol.* **44** (12) : 2409-2411.

- Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. et Marumo, F. (1991) Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin. *Hypertension* **18** (2) : 165-170.
- Firth, J. D., Raine, A. E., Ratcliffe, P. J., Ledingham, J. G. (1988) Endothelin : an important factor in acute renal failure. *Lancet* **19** : 1179-1181
- Fogo, A., Hellings, S.E., Inagami, T. et Kon, V. (1992). Endothelin receptor antagonism is protective in *in vivo* acute cyclosporin toxicity. *Kidney Int.* **42** : 770-774.
- Ganong, W.F. (1995) Review of Medical Physiology, 17<sup>e</sup> édition, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, 781 p.
- Giaid, A., Hamid, Q. A., Springall, D. R., Yanagisawa, M., Shinmi, O., Sawamura, T., Masaki, T., Kimura, S., Corrin, B., Polak, J. M. (1990) Detection of endothelin immunoreactivity and mRNA in pulmonary tumors. *J. Pathol.* **162** : 15-22
- Goetz, K. L. Wang, B. C., Madured, J. B., Zhu, J. L., Leadley, R. J., Jr. (1988) Cardiovascular, renal and endocrine responses in intravenous endothelin in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* **255** : R1064-R1069.
- Goppelt-Struebe, M. (1995) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **52** (4) : 213-222.
- Goppelt-Struebe, M. (1997) Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids.. *Biochem. Pharmacol* **53** : 1389-1395.
- Greenspan, F.S., Stewler, G.L. (1997) Basic & Clinical Endocrinology, 5<sup>e</sup> édition, Appleton & Lange, Stamford, Connecticut, 823 p.
- Grunfeld, J.P. (1990) Glucocorticoids in blood pressure regulation. *Horm. Res.* **34** : 111-113.
- Grunfeld, J.P. et Eloy, L. (1987) Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Hypertension* **10** : 608-618.

- Grunfeld, J.P., Eloy, L., Ramos-Frendo, B., Araujo, A., Rothschild, E. et Russo-Marie, F. (1987) Do glucocorticosteroids play a role in the regulation of blood pressure? A study performed with a glucocorticosteroid antagonist. *Advances in Nephrology From the Necker Hospital* **16** : 53-68.
- Haack, D., Möhring, B., Petri, M. et Hackenthal, E. (1977) Comparative study on development of corticosterone and DOCA hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* **233** : F403.
- Hahn, A.W., Resink, T.J., Scott-Burden, T., Powell, J., Dohi, Y. et Buhler, F.R. (1990) Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* **1** (9) : 649-659.
- Haynes, W.G., Strachan, B.N. et Webb, D. (1995) Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels *in vivo*. *Circulation* **92** (3) : 357-363.
- Haynes, W.G. et Webb, D.J. (1993) The endothelin family of peptides : local hormones with diverse roles in health and disease ? *Clin. Sci.* **84** : 485-500.
- Hirata, Y., Yoshimi, H., Takaichi, S., Yanagisawa, M. et Masaki, T. (1988) Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **239** : 13-17.
- Hiroaki, I., Eguchi, S., Fumiaki, M., Hirata, Y. (1998) Endothelin-1 stimulates DNA synthesis of vascular smooth muscle cells through transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31** (suppl. 1) : S182-S184
- Hom, G.J., Touhey, B. et Rubanyi, G.M. (1992) Effects of intracoronary administration of endothelin in anesthetized dogs: comparison with Bay k 8644 and U 46619. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **19** (2) : 194-200.
- Hu, J.R., Berninger, U.G. et Lang, R.E. (1988) Endothelin stimulates atrial natriuretic peptide (ANP) release from rat atria. *Eur. J. Pharmacol.* **158** : 177-178.



- Huang, L.Q., Whitworth, J.A. et Chesterman, C.N. (1995) Effects of cyclosporin A and dexamethasone on haemostatic and vasoactive functions of vascular endothelial cells. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **6** : 438-445.
- Ihara, M., Noguchi, K., Saeki, T., Fukuroda, T., Tsuchida, S., Kimura, S. L., Fukami, T., Ishikawa, K., Nishikibe, M., Yano, M. (1992) Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* **50** : 247-255.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. et Masaki, T. 1989 The human endothelin family : Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86** : 2863-2867
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. et Masaki, T. (1989) The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* **264** (25) : 14954-14959.
- Ishikawa, K., Ihara, M., Noguchi, K., Mase, T., Mino, N., Saeki, T., Fukuroda, T., Fikami, T., Ozaki, S., Nagese, T., Nishikibe, M. et Yano, M. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B receptor antagonist, BQ-788. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 4892-4896.
- Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. (1989a) Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.* **255** (Heart Circ. Physiol. 24) : H970-H973.
- Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Goto, K., Masaki, T. (1989b) Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflügers Arch.* **413** : 108-110
- Itoh, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, C., Kosaka, T., Inoue, A., Ishida, N., Mitsui, Y., Onda, H., Fujino, M., Masaki, T. 1988 Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin : Identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett.* **231** : 440-444.

- Iwasaki, S., Homma, T. et Kon, V. (1994) Site specific regulation in the kidney of endothelin and its receptor subtypes by cyclosporine. *Kidney Int.* **45** (2) : 592-597.
- Jacobson, L., Sapolsky, R. (1991) The rôle of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews* **12** : 118.
- Janakidevi, K., Fisher, M. A., Del Vecchio P. J., Tiruppathi, C., Figge, J., Malik, A. B. (1992) Endothelin-1 stimulates DNA synthesis and proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **263** : C1295-C1301.
- Kalbak, K. (1972) Incidence of arteriosclerosis in patients with rheumatoid arthritis receiving long-term corticosteroid therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **31**(3) : 196-200.
- Kanse, S.M., Takahashi, K., Warren, J.B., Ghatei, M. et Bloom, S.R. (1991) Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* **199** : 99-101.
- Kanse, S.M., Takahashi, K., Warren, J.B., Perera, T., Porta, M., Ghatei, M. et Bloom, S.R. (1991) Production of endothelin by vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** (Suppl 7) : S113-S116.
- Karne, S., Jayawickreme, CK. et Lerner, MR. 1993 Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J. Biol. Chem.* **268** : 19126-19133
- Kato, H., Hayashi, T., Koshino, Y., Oida, K., Kutsumi, Y., Nakai, T. et Miyabo, S. (1995) Autocrine production of endothelin-1 participates in the glucocorticoid-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx into vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208** (1) : 82-88.
- Kido, T., Sawamura, T., Masaki, T. (1998) The processing pathway of endothelin-1 production. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **31** (Suppl 1): S13-5.

- Kitamura, K., Tanaka, T., Kato, J., Eto, T. et Tanaka, K. (1989) Regional distribution of immunoreactive endothelin in porcine tissue: abundance in inner medulla of kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161** (1) : 348-352.
- Kitazumi, K. et Tasaka, K. (1992) Thrombin-stimulated phosphorylation of myosin light chain and its possible involvement in endothelin-1 secretion from porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **43** (8) : 1701-1709.
- Kitazumi, K. et Tasaka, K. (1993) The role of c-Jun protein in thrombin-stimulated expression of preproendothelin-1 mRNA in porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **46** (3) : 455-463.
- Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I. et Forstermann, U. (1996) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol. Pharmacol.* **49** (1) : 15-21.
- Kloog, Y., Ambar, I., Sokolvosky, M., Kochva, E., Wollberg, Z. et Bdolah, A. (1988) Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide : Phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain. *Science* **242** : 268-270.
- Knowlton, A.I., Loeb, E.N., Stoerk, H.C., White, J.P. et Heffernam, J.F. (1952) *J. Expl. Med.* **96** : 187
- Kohno, M., Yasunari, K., Murakawa, K., Yokakawa, K., Horio, T., Fukui, T., Takeda, T. (1990) Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am. J. Med.* **88** : 614-18
- Koide, M., Kawahara, Y., Tsuda, T., Ishida, Y., Shii, K., Yokoyama, M. (1992) Endothelin-1 stimulates tyrosine phosphorylation and the mitogen-activated protein kinases in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Hypertension* **10** : 1173-82.
- Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yasaki, Y. (1988) Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **238** : 249-252.

- Kon, V., Sugiura, M., Inagami, T., Hoover, R.L., Fogo, A., Harvie, B.R. et Ichikawa, I. (1990). Cyclosporin causes endothelin-dependant acute renal failure. *Kidney Int.* **37** : 1487-1491.
- Koseki, C., Imai, M., Hirata, Y., Yanagisawa, M., Masaki, T. (1989) Autoradiographic distribution in rat tissues of binding sites for endothelin :a neuropeptide ? *Am. J. Physiol.* **256** : R858-R866.
- Kourembanas, S., Marsden, P.A., McQuillan, L.P. et Faller, D.V. (1991) Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.* **88** (3) : 1054-1057.
- Krakoff, L.R., Selvadurai, R. et Salter, E. (1975) Effect of methylprednisolone upon arterial pressure and the renin angiotensin system in the rat. *Am. J. Physiol.* **228** : 613.
- Krum, H., Viskoper, R.J., Lacourciere, Y., Budde, M. et Charlton, V. (1998) The effect of an endothelin-receptor antagonist, Bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **338** : 784-790.
- Kurihara, H., Yoshizumi, M., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. et Yazaki, Y. (1989) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159** (3): 1435-1440.
- Kurowski, T.T., Chatterton, R.J. et Hickson, R.C. (1984) Glucocorticoid-induced cardiac hypertrophy: additive effects of exercise. *J. Appl. Physiol. : Respir., Environm. & Exercise Physiol.* **57** : 514-519.
- Lam, H.C., Takahashi, K., Ghattei, M.A., Warrens, A.N., Rees, A.J. et Bloom, S.R. (1991). Immunoreactive endothelin in human placenta, urine, milk, and saliva. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** (Suppl.7) : S390-S393.
- Landan, G., Bdolah, A., Wollberg, Z., Kochva, E., Graur, D. (1991) Evolution of the sarafotoxin/endothelin superfamily of proteins. *Toxicon* **29** : 237-244.

- Laporte, J., D'Orléans-Juste, P., Singh, G. et Sirois, P. (1995) Dexamethasone and phosphoramidon inhibit endothelin release by cultured nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26** (Suppl 3) : S53-S55.
- Laporte, S., Denault, J.B., D'Orleans-Juste, P., Leduc, R. (1993) Presence of furin mRNA in cultured bovine endothelial cells and possible involvement of furin in the processing of the endothelin precursor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **22** (Suppl 8) : S7-10.
- Lariviere, R., Day, R., Schiffrin, E.L. (1993) Increased expression of endothelin-1 gene in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* **21**(6 Pt 2) : 916-20.
- Lee, M.E., Bloch, K.D., Clifford, J.A. et Quertermous, T. (1990) Functional analysis of the endothelin-1 gene promoter. Evidence for an endothelial cell-specific cis-acting sequence. *J. Biol. Chem.* **265** (18) : 10446-10450.
- Lee, M.E., Dhadly, M.S., Temizer, D.H., Clifford, J.A., Yoshizumi, M. et Quertermous, T. (1991) Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J. Biol. Chem.* **266** (28) : 19034-19039.
- Lerman, A., Click, R. L., Narr, B. J., Weisner, R. H., Krom, R. A. F., Textor, S. C., Burnett, J. C., Jr. (1991) Elevation of plasma endothelin associated with systemic hypertension in humans following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* **51** : 646-650.
- Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein D. M., Sandberg, S. M., Burnett, J. C. (1991) Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **325** : 997-1001.
- Lerman, A., Kubo, S. H., Tschumperlin, L. K., Burnett, J. C., Jr. (1992) Plasma endothelin concentrations on humans with end-stage heart failure and after heart transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **20** : 849-53.
- Lopez-Farre, A., Montanes, I., Millas, I., Lopez-Novoa, J. M. (1989) Effect of endothelin on renal function in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **163** : 187-9.

- Luscher, T. F., Yang, Z., Diederich, D., Buhler, F. R. (1989) Endothelium-derived vasoactive substances :Potential role in hypertension, artherosclerosis and vascular occlusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **14** (Suppl. 6) : S63-S69.
- Makita, N., Iwai, N., Inagami, T. et Badr, K.F. (1992) Two distinct pathways in the down-regulation of type-1 angiotensin II receptor gene in rat glomerular mesengial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **185** : 142-146.
- Malek, A. et Izumo, S. (1992) Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am. J. Physiol.* **263** (2 pt 1) : C389-C396.
- Marsden, P.A. et Brenner, B.M. (1992) Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am. J. Physiol.* **262** (4 pt 1) : C854-C861.
- Marsden, P.A., Dorfmann, D.M., Collins, T., Brenner, B.M., Orkin, S.H. et Ballermann, B.J. (1991) Regulated expression of endothelin 1 in glomerular capillary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **261** (1 pt 2) : F117-F125.
- Marsen, T.A., Simonson, M.S. et Dunn, M.J. (1995) Thrombin induces the preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine kinase-linked mechanism. *Circ. Res.* **76** (6) : 987-995.
- Masaki, T. (1993) Endothelins : Homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocr. Rev.* **14** : 256-68.
- Masaki, T. (1993) The effect of endothelin on the circulation system. *New Perspectives*, San Diego, Academic. pp.87-105.
- Mateo, A.O. et De Artinano, A.A. (1997) Highlights on endothelins : A review. *Pharmacol. Res.* **36** (5) : 339-351.
- Matsumura, Y., Nakase, K., Ikegawa, R., Hayashi, K., Ohyama, T., Morimoto, S. (1989) The endothelium-derived vasoconstrictor peptide endothelin inhibits renin release *in\_vitro*. *Life Sci.* **44** : 149-57.

- Mattoli, S., Soloperto, M., Marini, M., Fasoli, A. (1991) Levels of endothelin in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with symptomatic asthma and reversible airflow obstruction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88** (3 pt. 1) : 376-84.
- Mendlowitz, M., Gitlow, S.E. et Naftchi, N. (1958) Work of digital vasoconstriction produced by infused norepinephrine in Cushing's syndrome. *J. Appl. Physiol.* **13** : 252-256.
- Miller, W.L., Redfield, M. M., Burnett, J. C. (1989) Integrated cardiac, renal, and endocrine actions of endothelin. *J. Clin. Invest.* **83** : 317-20.
- Miyauchi, T., Ishikawa, T., Tomobe, Y., Yanagisawa, M., Kimura, S. (1989) Characteristics of pressor response to endothelin in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension* **14** : 427-34.
- Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Tomizawa, T., Sugishita, Y., Suzuki, N., Fujino, M., Ajisaka, R., Goto, K. et Masaki, T. (1989) Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* **2** (8653) : 53-54.
- Moncada, S.R., Palmer, M., and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide : Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43** : 109-129.
- Monfar, M., et Blenis, J. (1996) Inhibition of p70/p85 S6 kinase activities in T cells by dexamethasone. *Mol. Endocrinol.* **10** (9) : 1107-15.
- Moravec, C.S., Reynolds, E. E., Stewart, R. W., Bond, M. (1989) Endothelin is a positive inotropic agent in the human and rat heart *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159** : 14-18.
- Moreland, S., McMullen, D.M., Abboa-Offei, B. et Seymour, A. (1994) Evidence for differential location of vasoconstrictor endothelin receptors in the vasculature. *Br. J. Pharmacol.* **112** : 704-708.
- Moreland, S., McMullen, D.M., Delaney, C.L., Lee, V.G. et Hunt, J.T. (1992) Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET<sub>B</sub> -like receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** : 100-106.

- Nambi, P., Pullen, M., Hsiao-Ling, W., Nuthulaganti, P., Elshourbagy, N. et Kumar, C. (1992) Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin receptors in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **267** (27) : 19555-19559.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB* **6** : 3051-3056.
- Nevins, J.R. (1983) The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Annu. Rev. Biochem.* **52** : 441-446.
- Nishimura, J., Chen, X., Jahan, H., Shikasho, T., Kobayashi, S. et Kanaide, H. (1992) cAMP induces up-regulation of ETA receptor mRNA and increases responsiveness to endothelin-1 of rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188** (2) : 719-726.
- Ogawa, H., Tadokoro, S., Kirihara, R., Kawakami, K. et Shibata, K. (1965) *Gumma. Med. J. Sci.* **14** : 107.
- Ohkubo, S., Ogi, K., Hosoya, M., Matsumoto, H., Suzuki, N., Kimura, C., Ondo, H. et Fujino, M. (1990) Specific expression of human endothelin-2 (ET-2) gene in a renal adenocarcinoma cell line. *FEBS Lett.* **274** : 136-140.
- Okuno, T., Suzuki, H. et Saruta, T. (1981) Dexamethasone hypertension in rats. *Clin. Exp. Hypertension* **3** (5) : 1075-1086.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Feener, E.P., Lee, M.E., Loeken, M.R., Shiba, T., Quertermous, T. et King, G.L. (1991) Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **266** (34) : 23251-23256.
- Orita, Y., Fugiwara, Y., Ochi, S., Takama, T., Fukunaga, M. et Yokoyama, K. (1989) Endothelin-receptors in rat renal glomeruli. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13** (Suppl. 5) : S159-S161.
- Paliogianni, F., Hama, N., Balow, J. E., Valentine, M. A. et Boumpas, D. T. (1995) Glucocorticoid-mediated regulation of protein phosphorylation in primary human



- T cells. Evidence for induction of phosphatase activity. *J. Immunol.* **155** (4) : 1809-17.
- Paul, M., Zintz, M., Bocker, W. et Dyer, M. (1995) Characterization and functional analysis of the rat endothelin-1 promoter. *Hypertension* **25** (4 pt 2) : 683-693.
- Phillipe, J. et Missotten, M. (1990) Dexamethasone inhibits insulin biosynthesis by destabilizing insulin messenger ribonucleic acid in hamster insulinoma cells. *Endocrinology* **127** : 1640-1645.
- Pirpiris, M., Sudhir, K., Yeung, S., Jennings, G. et Whitworth, J.A. (1992) Pressor responsiveness in corticosteroid-induced hypertension in humans. *Hypertension* **19** : 567-574.
- Pollock, D.M. et Opgenorth, T.J. (1993) Evidence for endothelin-induced renal vasoconstriction independent of ETA receptor activation. *Am. J. Physiol.* **264** (1 pt 2) : R222-R226.
- Provencher, P.H., Saltis, J. et Funder, J.W. (1995) Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **52** (3) : 2219-225.
- Provencher, P.H., et Chisholm, J.D. (1996) Glucocorticoids increase vasopressin (V1a) receptor number and expression in vascular smooth muscle cells. *Tenth International Congress of endocrinology*, San Francisco, 18-21 Juin, no. P1-240.
- Rachmilewitz, D., Eliakim, R., Ackerman, Z. et Karmeli, F. (1992) Colonic endothelin-1 immunoreactivity in active ulcerative colitis. *Lancet* **339** : 1062.
- Rakugi, H., Nakamura, M., Saito, H., Higaki, J. et Ogihara, T. (1988) Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155** : 1244-1247.
- Redmond, E.M., Cahill, P.A., Hodges, R., Zhang, S. et Sitzmann, J.V. (1996) Regulation of endothelin receptors by nitric oxide in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* **166** (3) : 469-479.

- Resink, T.J., Hahn, A.W., Scott-Burden, T., Powell, J., Weber, E., Buhler, F.R. (1990) Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**(3) : 1303-10.
- Roubert, P., Gillard, V., Plas, P., Guillon, J.M., Chabrier, P.E. et Braquet, P. (1989) Angiotensin II and phorbol-esters potently down-regulate endothelin (ET-1) binding sites in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164** (2) : 809-815.
- Roubert, P., Viossat, I., Longchamp, M., Chapelat, M., Schulz, J., Plas, P., Gillard-Roubert, V., Chabrier, P., Braquet, P. (1993) Endothelin receptor regulation by endothelin synthesis in vascular smooth muscle cells : effects of dexamethasone and phosphoramidon. *J. Vasc. Res.* **30** : 139-144.
- Rousseau, G.G., (1984) Control of gene expression by glucocorticoid hormones. *Bioch. J.* **224** : 1-12
- Rubanyi, G.M. et Polokoff, M.A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* **46** (3) : 325-415.
- Saito, Y., Nakao, K., Mukoyama, M. et Imura, H. (1989) Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **322** : 305.
- Sakurai, T., Morimoto, H., Kasuya, Y., Takuwa, Y., Nakauchi, H., Masaki, T. et Goto, K. (1992) Level of ET<sub>B</sub> receptor mRNA is down-regulated by endothelins through decreasing the intracellular stability of mRNA molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** (1) : 342-347.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Inoue, A., Ryan, U.S., Kimura, S., Mitsui, I., Goto, K. et Masaki, T. (1991) cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175** : 44-47.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. et Masaki, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* **348** (6303) : 732-735.

- Saruta, T., Suzuki, H., Handa, M., Igarashi, Y., Kondo, K., Senba, S. (1986) Multiple factors contribute to the pathogenesis of hypertension in Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **62** : 275-279.
- Sato, A., Suzuki, H., Nakazato, Y., Shibata, H., Inagami, T. et Saruta, T. (1994) Increased expression of vascular angiotensin II type 1A receptor gene in glucocorticoid-induced hypertension. *Journal of Hypertension* **12** (5) : 511-516.
- Schini, V.B., Hendrickson, H., Heublein, D.M., Burnett, J.C.Jr. et Vanhoutte, D.M. (1989) Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* **165** : 333-334.
- Schrader, J., Tebbe, U., Borrics, M., Ruschitzka, F., Schoel, G., Kandt, M., Warneke, G., Zuchner, C., Weber, M.H., Neu, U., Rath, W. et Henning, H.V. (1990) Plasma-endothelin bei normalperson und patienten mit nephrologisch-rheumatologischen und kardiovaskularen erkrankungen. *Klin. Wochenschr.* **68** : 774-779.
- Schrey, M.P., Patel, K.V. et Tezapsidis, N. (1992) Bombesin and glucocorticoids stimulate human breast cancer cells to produce endothelin, a paracrine mitogen for breast stromal cells. *Cancer Res.* **52** (7) : 1786-1790.
- Sharefkin, J.B., Diamond, S.L., Eskin, S.G., McIntire, L.V. et Dieffenback, C.W. (1991) Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* **14** (1) : 1-9.
- Shaw, G. et Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46** (5) : 659-667.
- Shiba, R., Sakurai, T., Yamada, G., Morimoto, H., Saito, A., Masaki, T. et Goto, K. (1992) Cloning and expression of rat preproendothelin-3 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** (1) : 588-594.
- Shibata, K., Komatsu, C., Misumi, Y. et Furukawa, T. (1995) Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin B receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res.* **692** (1-2) : 71-78.

- Shubeita, H. E., McDonough, P. M., Harris, A. N., Knowlton, K. U., Glembocki, C. C., Brown J.H., Chien, K. R. (1990) Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biochem. Chem.* **265** : 20555-20562.
- Simonson, M.S., Dunn, M.J. (1990) Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J.* **4** : 2989-3000.
- Simonson, M.S. et Dunn, M.J. (1991). Endothelin peptides : a possible rôle in glomerular inflammation. *Lab. Invest.* **64** : 1-4.
- Stanimirovic, D.B., McCarron, R.M. et Spatz, M. (1994) Dexamethasone down-regulates endothelin receptors in human cerebrovascular endothelial cells. *Neuropeptides* **26** : 145-152.
- Stephenson, K., Gandhi, C. et Olson, M.S. (1994) Biological Actions of endothelin *Vitamins and hormones*, Academic Press, Inc. , vol **48**, pp 157-198.
- Stewart, D.J., Levy, R.D., Cernacek, P. et Langleben, D. (1991b) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension : marker or mediator of disease ? *Intern. Med.* **114** : 464-469.
- Sudhir, K., Jennings, G.L., Esler, M.D., Korner, P.I., Blombery, P.A., Lambert, G.W., Scoggins, B. et Whitworth, J.A. (1989) Hydrocortisone-induced hypertension in humans: pressor responsiveness and sympathetic function. *Hypertension* **13** : 416-421.
- Sudjarwo, S.A., Hori, M., Tanaka, T., Matsuda, Y., Okada, T. et Karaki, H. (1994) Subtypes of endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediating venous smooth muscle contraction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200** : 627-633.
- Sumner, M.J., Cannon, T.R., Mundin, J.W., White, D.G. et Watts, I.S. (1992) Endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br. J. Pharmacol.* **107** : 858-860.

- Suzuki, N., Miyauchi, T., Tomobe, T., Matsumoto, H., Goto, K., Masaki, T., Fujino, M. (1990) Plasma concentrations of endothelin-1 in spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167** : 941-947.
- Takagi, M., Matsuoka, H., Atarashi, K. et Yagi, S. (1988) Endothelin : a new inhibitor of renin release *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157** : 1164-1168.
- Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Yamashita, K., Masaki, T. (1989) A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264** : 7856-7861.
- Tasaka, K. et Kitazumi, K. (1994) The control of endothelin-1 secretion. *Gen. Pharmacol.* **25** (6) : 1059-1069.
- Thiemermann, C., Lidbury, P.S., Thomas, G.R. et Vane, J.R. (1989) Endothelin-1 releases prostacyclin and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anesthetized rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13** (suppl 5) : S138-141 ; discussion S142.
- Tomita, K., Ujiie, K., Nakanishi, T., Tomura, S., Matsuda, O., Ando, K., Shichiri, M., Hirata, Y. et Marumo, F. (1990). Plasma endothelin levels in patients with acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* **321** : 1127.
- Tsukahara, H., Ende, H., Magazine, H.I., Bahou, W.F., and Goligorsky, M.S. (1994) Molecular and functional characterisation of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells : Receptor coupling too nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269** : 21778-21785.
- Vigne, P., Marsault, R., Breittmayer J. P., Frelin, C. (1990) Endothelin stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and DNA synthesis in brain capillary endothelial cells. *Biochem. J.* **226** : 415-420.
- Vittori, E., Marini, M., Fasoli, A., De Franchis, R. et Mattoli, S. (1992) Increased expression of endothelin in bronchial epithelial cells of asthmatic patients and effect of corticosteroids. *Am. Rev. Respir. Dis.* **146** (5 pt 1) : 1320-1325.

- Walker, B.R., Best, R., Shackleton, C.H.L., Padfield, P.L. et Edwards, C.R.W. (1996) Increased vasoconstrictor sensitivity to glucocorticoids in essential hypertension. *Hypertension* **27** : 190-196.
- Warner, T.D., Schmidt, H.H.H.W. et Murad, F. (1992) Interactions of endothelins and EDRF in bovine native endothelial cells : selective effects of endothelin-3. *Am. J. Physiol.* **262** : H1600-H1605.
- Wilson, D.B., Dorfman, D.M. et Orkin, S.H. (1990) A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **10** (9) : 4854-4862.
- Wilson J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M. et Larsen, P.R. (1998) Williams textbook of endocrinology, 9e édition, Saunders Company, Philadelphie, Pennsylvanie, 1819p.
- Whitworth, J.A. (1986) Pressor responsiveness in steroid-induced hypertension in man. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **13** : 35-38.
- Whitworth, J.A. (1994) Studies on the mechanisms of glucocorticoid hypertension in humans. *Blood Pressure* **3** : 24-32.
- Whitworth, J.A., Coghlan, J.P., Denton, D.A., Graham, W.F., Humphery, T.J. et Scoggins, B.A. (1979) Comparison of the effects of 'glucocorticoid' and mineralocorticoid' infusions on blood pressure in sheep. *Clin. Exp. Hypertension* **1** : 649.
- Whitworth, J.A., Hewitson, T.D., Ming, L., Wilson, R.S., Scoggins, B.A., Wright, R.D. et Kincaid-Smith, P. (1990) Adrenocorticotrophin-induced hypertension in the rat: haemodynamic, metabolic and morphological characteristics. *J. Hypertension* **8** ; 27-36.
- Yagil, Y. et Krakoff, L.R. (1988) The differential effect of aldosterone and dexamethasone on pressor responses in adrenalectomized rats. *Hypertension* **11** : 174-178.

- Yagil, Y., Koreen, R. et Krakoff, L.R. (1986) The differential role of mineralocorticoids and glucocorticoids in blood pressure regulation in normotensive rats. *Am. J. of Physiol.* **251** : H1354-H1360.
- Yamane, K., Kashiwagi, H., Suzuki, N., Miyauchi, T., Yanagisawa, M., Goto, K. et Masaki, T. (1991) Elevated plasma levels of endothelin-1 in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **34** : 342-344.
- Yanagisawa, M., Akhiro, I., Ishikawa, T., Kasuya, Y., Kimura, S., Kumagaye, S.H., Nakijima, K., Watanabe, T., Sakakibara, S., Goto, D. et Masaki, T. (1988b) Primary structure, synthesis and biological activity of rat endothelin and endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 6964-6967.
- Yanagisawa, M., Inoue, A., Takawa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M. et Masaki, T. (1989) The human preproendothelin-1 gene: Possible regulation by endothelial phosphoinositide turnover signaling. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13** (Suppl 5) : S13-S17.
- Yanagisawa, M., Kurahara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Goto, K., Masaki, T. (1988a) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332** : 411-415.
- Yanagisawa, M. et Masaki, T. (1989) Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control. *Biochem. Pharmacol.* **38** (12) : 1877-1883.
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Morita, T., Yamashita, T., Oh-hashii, Y., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. et Yazaki, Y. (1990) Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166** (1) : 324-329.
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T. et Yazaki, Y. (1990) Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161** : 859-864.